

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALE DO JEQUITINHONHA E MUCURI
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Vanessa Luciene Siqueira

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE DO EXTRATO ETANÓLICO DA
***CROTON ANTISYPHILITICUS* EM FERIDAS CUTÂNEAS DE RATOS**

Diamantina
2019

Vanessa Luciene Siqueira

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE DO EXTRATO ETANÓLICO DA
CROTON ANTISYPHILITICUS EM FERIDAS CUTÂNEAS DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Cynthia Fernandes Ferreira Santos

**Diamantina
2019**

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S618a

Siqueira, Vanessa Luciene

Avaliação da atividade cicatrizante do extrato etanólico da *Croton antisiphiliticus* em feridas cutâneas de ratos / Vanessa Luciene Siqueira, 2019.

92 p. :il.

Orientadora: Cynthia Fernandes Ferreira Santos

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Dimantina, 2019.

1. *Croton antisiphiliticus*. 2. Cicatrização. 3. Plantas medicinais. I. Santos, Cynthia Fernandes Ferreira. II. Título. III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 615.321

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecária Nádia Santos Barbosa – CRB6/3468.

VANESSA LUCIENE SIQUEIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE DO EXTRATO ETANÓLICO
DA *CROTON ANTISYPHILITICUS* EM FERIDAS CUTÂNEAS DE RATOS**

Dissertação apresentada ao
MESTRADO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS, nível de
MESTRADO como parte dos requisitos
para obtenção do título de MESTRA
EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Orientador (a): Prof.ª Dr.ª Cynthia
Fernandes Ferreira Santos

Data da aprovação : 18/01/2019


Prof.Dr.ª CYNTHIA FERNANDES FERREIRA SANTOS - UFVJM


Prof.Dr. WAGNER DE FÁTIMA PEREIRA - UFVJM


Prof.Dr. JOAO LUIZ DE MIRANDA - UFVJM

Aos meus amados pais Vanuza e Siqueira, meus irmãos Karen e Gabriel e meu namorado,
companheiro e amigo Flauvi por todo apoio, força e compreensão e a minha amada sobrinha
Sara que com seu carinho e sorrisos sempre torna todos os momentos mais leves.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me manter com a fé inabalável e ter me concedido força, paciência e discernimento em todos os momentos desta etapa.

A minha família e namorado por todo suporte, incentivo e compreensão pelos momentos de ausência.

Aos membros da minha querida equipe de Enfermagem no CTI da Santa Casa de Caridade de Diamantina pela torcida por minha vitória.

Ao Departamento de Farmácia por possibilitar minha participação no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

A minha orientadora, professora Cynthia Fernandes Ferreira Santos, que dentre suas várias funções, aceitou me ajudar neste processo.

A professora Maria Letícia, pela essencial colaboração com seu tempo e conhecimento.

A todos que contribuíram de alguma forma com a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

Uma das formas utilizadas para recuperação de feridas pela população é o uso de produtos naturais como as plantas medicinais, dentre tais espécies temos a *Croton antisiphiliticus* que desde o século XIX é utilizada popularmente para tal tratamento. O presente trabalho objetivou avaliar a atividade do extrato etanólico da *Croton antisiphiliticus* na cicatrização de feridas em ratos. Foram utilizados 07 ratos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar. Em cada animal foram produzidas 4 feridas mecânicas paravertebrais submetidas cada uma a diferente tratamento. A primeira ferida não recebeu tratamento sendo denominada sem tratamento (ST), a segunda ferida foi tratada apenas com o veículo, sendo o gel de carbopol (G), a terceira ferida foi tratada com o gel associado ao extrato etanólico da *Croton antisiphiliticus* 5% (G5%); e a quarta ferida foi tratada com o gel associado ao extrato etanólico da *Croton antisiphiliticus* 10% (G10%). Para investigação do resultado experimental foi avaliado o período de retração das feridas e avaliação histológica de amostras dos tecidos cicatriciais coletados ao final do último dia de acompanhamento dos animais, com análise da angiogênese, células mononucleares, proliferação fibroblástica, re-epitelização e colagenização. Na avaliação macroscópica foi possível notar a diminuição gradativa das feridas e aumento da retração percentual das feridas no decorrer do estudo. As áreas das feridas regrediram de maneira expressiva em todos os grupos. Houve diferença entre o grupo G5% e o grupo ST nos dias 09, 10 e 13 de tratamento e entre o grupo G10% e o ST no 11º dia do tratamento. Com a avaliação microscópica foi obtido que de acordo com a avaliação da proliferação vascular foi observada presença de maior quantidade de novos vasos sanguíneos nos grupos G5% e G10%, os quais diferiram de ST. Em relação a intensidade de células mononucleares foi identificada diferença entre o grupo ST e os grupos G5% e G10%, sendo encontradas em maior quantidade em G5% e G10% que em ST. Na proliferação fibroblástica, colagenização e re-epitelização não foram identificadas diferenças entre os grupos. Os resultados do presente estudo permitem concluir que o uso tópico do extrato etanólico da *Croton antisiphiliticus* não apresenta efeito na cicatrização da pele em feridas cirúrgicas de ratos. Sua utilização no processo de cicatrização de feridas cutâneas permanece ainda campo aberto a estudos, no entanto é importante que se amplie o estudo experimental com outras doses e com análise de outros tempos do processo cicatricial, bem como possíveis mecanismos envolvidos no processo cicatricial.

Palavras chaves: *Croton antisiphiliticus*, cicatrização, plantas medicinais.

ABSTRACT

One of the ways used for recovery of wounds by the population is the use of natural products such as medicinal plants, among such species we have *Croton antisiphiliticus* that since the XIX century is popularly used for such treatment. The present work aimed to evaluate the activity of the ethanolic extract of *Croton antisiphiliticus* in the healing of wounds in rats. Eight rats (*Rattus norvegicus albinus*) of the Wistar lineage were used. In each animal 4 paravertebral mechanical wounds were each submitted to different treatment. The first wound received no treatment being called untreated (ST), the second wound was treated only with the vehicle, being the carbopol gel (G), the third wound was treated with the gel associated with the ethanolic extract of *Croton antisiphiliticus* 5% (G5%); and the fourth wound was treated with the gel associated with the ethanolic extract of *Croton antisiphiliticus* a 10% (G10%). In order to investigate the experimental results, the period of retraction of the wounds and histological evaluation of the scar tissue samples collected at the end of the last day of follow-up of the animals were evaluated, with analysis of angiogenesis, mononuclear cells, fibroblast proliferation, re-epithelization and collagenization. In the macroscopic evaluation it was possible to notice the gradual decrease of the wounds and increase of the percentage retraction of the wounds during the course of the study. Wound areas regressed significantly in all groups. There was a difference between the G5% group and the ST group on treatment days 09, 10 and 13 and between the G10% and ST groups on the 11th day of treatment. With the microscopic evaluation it was obtained that according to the evaluation of the vascular proliferation was observed presence of a greater amount of new blood vessels in the G5% and G10% groups, which differed from ST. In relation to the intensity of mononuclear cells, a difference was observed between the ST group and the G5% and G10% groups, being found in greater quantity in G5% and G10% than in ST. In the fibroblastic proliferation, collagenization and re-epithelization, no differences between groups were identified. The results of the present study allow us to conclude that the topical use of the ethanolic extract of *Croton antisiphiliticus* has no effect on the healing of the skin in surgical wounds of rats. Its use in the wound healing process still remains open field of studies, however it is important to expand the experimental study with other doses and with analysis of other times of the cicatricial process, as well as possible mechanisms involved in the cicatricial process.

Key words: *Croton antisiphiliticus*, healing, medicinal plants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Representação gráfica da anatomia da pele.....	32
Figura 2- Partes aéreas da <i>Croton antisiphiliticus</i>	41
Figura 3- Estrutura química dos constituintes da <i>Croton antisiphiliticus</i>	44
Figura 4- Manutenção dos animais.....	48
Figura 5- Processo de preparo do EBE-Ca.....	49
Figura 6- Feridas paravertebrais após o ato operatório.....	51
Figura 7- Medição da ferida com paquímetro digital.....	52
Figura 8- Evolução dos grupos de feridas por dia de avaliação.....	63
Figura 9- Avaliação histológica do processo de cicatrização de feridas induzidas na pele de ratos e tratadas ou não com extrato etanólico da <i>Croton antisiphiliticus</i>	66
Figura 10- Avaliação histológica da colagenização observada no processo de cicatrização de feridas induzidas na pele de ratos e tratadas ou não com <i>Croton antisiphiliticus</i>	71

LISTA DE QUADRO

Quadro 1- Classificação e atribuição de índices aos achados histológicos de HE (Hematoxilina – Eosina) e TM (Tricrômico de Masson).....	56
--	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Tamanho da ferida em mm ² no início e no final do estudo.....	60
Gráfico 2- Regressão do tamanho das feridas no decorrer dos tratamentos.....	61
Gráfico 3- Retração percentual da ferida antes e após os tratamentos.....	62
Gráfico 4- Avaliação da proliferação vascular.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Peso dos animais no decorrer do experimento.....	59
Tabela 2- Intensidade da proliferação vascular observada no processo de reparação tecidual.....	65
Tabela 3- Intensidade de mononucleares observados no processo de reparação tecidual.....	67
Tabela 4- Intensidade da proliferação fibroblástica observada no processo de reparação tecidual.....	68
Tabela 5- Intensidade da re-epitelização observada no processo de reparação tecidual.....	69
Tabela 6- Intensidade da colagenização observada no processo de reparação tecidual.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS

a.C.- Antes de Cristo

Mart.- Martius

LISTA DE SIGLAS

BFG- Brazil Flora Group

CEUA- Comissão de Ética no Uso de Animais

CONCEA- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DST- Doença sexualmente transmissível

EBE-Ca- Extrato bruto etanólico da *Croton antisiphiliticus*

EGF- Fator de crescimento epitelial

EKA- Ácido caurenóico

EROs- Espécies Reativas de Oxigênio

G- Grupo de feridas tratadas apenas com o veículo

G10%- Grupo de feridas tratadas com o gel associado ao extrato etanólico da *Croton antisiphiliticus* a 10%

G5%- Grupo de feridas tratadas com o gel associado ao extrato etanólico da *Croton antisiphiliticus* a 5%

GO- Goiás

HE- Hematoxilina – Eosina

LPP- Lesão por Pressão

LPP-UFVJM - Laboratório de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

MG- Minas Gerais

NPUAP- *National Pressure Ulcer Advisory Panel*

PDGF- Fator de crescimento derivado de plaquetas

ST- Grupo de feridas sem tratamento

TGF- β - Fator de crescimento transformador beta

TM- Tricrômico de Masson

TNF- Fator de necrose tumoral

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

UFMG- Universidade Federal de Minas Gerais

UFVJM- Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

VEGF- Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 OBJETIVOS.....	29
2.1 Geral.....	29
2.2 Específicos.....	29
3 REFERENCIAL TEÓRICO	31
3.1 Morfologia da pele.....	31
3.2 Ferida	32
3.2.1 Feridas agudas	33
3.2.2 Feridas crônicas.....	33
3.3 Cicatrização de feridas.....	34
3.3.1. Fase inflamatória.....	35
3.3.2 Fase proliferativa.....	36
3.3.3 Fase de maturação ou remodelamento	37
3.4 Plantas medicinais	38
3.4.1 Gênero <i>Croton</i>	39
3.4.1.1 <i>Croton antisyphiliticus</i>	40
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
4.1 Animais.....	47
4.2 Produção do extrato.....	48
4.3 Produção do gel	49
4.4 Delineamento experimental.....	50
4.5 Avaliação macroscópica.....	52
4.6 Processamento histológico	53
4.6.1 Coloração com hematoxilina-eosina	54
4.6.2 Coloração com Tricômico de Masson.....	54
4.6.3 Montagem das lâminas	55
4.7 Análise microscópica.....	55
4.8 Análise estatística	57
5 RESULTADOS.....	59
5.1 Avaliação macroscópica.....	59
5.2 Análise microscópica.....	63
5.2.1 Proliferação vascular	64
5.2.2 Células mononucleares	67
5.2.3 Proliferação fibroblástica	67
5.2.4 Re-epitelização.....	68

5.2.5 Colagenização	69
6 DISCUSSÃO	73
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
REFERÊNCIAS	83

1 INTRODUÇÃO

Feridas são lesões caracterizadas pela descontinuidade de alguma estrutura do corpo (NGUYEN; ORGILL; MURPHY, 2009). Podem ser induzidas por infecções, traumas, acometimentos químicos, radiação, falta de oxigênio e de nutrientes (OSTVAR *et al.*, 2015; MAYER *et al.*, 2018).

As feridas estão presentes na população brasileira de forma geral, sem distinção de sexo, idade ou etnia (MORAIS, 2008). Seu significativo impacto em relação às despesas de saúde se deve não só aos gastos com tratamentos, mas também às elevadas taxas de morbidade, recidivas e comprometimento da qualidade de vida dos pacientes (ALVES *et al.*, 2015; CORRÊA *et al.*, 2016). Para tratamento de feridas de membros inferiores no ano 2000, por exemplo, foram realizadas 61.000 internações nos hospitais públicos brasileiros (BRASIL, 2018).

Para cura do tecido lesado de forma adequada é necessário um meio favorável, do contrário, há uma interrupção ou atraso na recuperação e a ferida pode tornar-se crônica (MIURA; YAMASHITA, 2018).

As altas taxas de prevalência, incidência e do impacto socioeconômico para os pacientes, seus familiares, serviços de saúde e sociedade em geral, faz com que as feridas crônicas obtenham atenção especial dos profissionais de saúde (DOMANSKY; BORGES, 2014; LIEDKE; JOHANN; DANSKI, 2014). Os custos dos tratamentos realizados em feridas crônicas podem chegar até 25 bilhões de dólares por ano nos Estados Unidos (SEN *et al.*, 2009).

As feridas crônicas mais prevalentes são as úlceras do pé diabético, úlceras venosas e as lesões por pressão (FRYKBERG; BANKS, 2015; JÄRBRINK *et al.*, 2017; TROSTRUP *et al.*, 2018).

Estima-se que 70% a 80% das úlceras de membros inferiores são feridas venosas, 8% arteriais, 3% diabéticas, 2% são as resultantes de traumas e 14% são outros tipos, como as úlceras por pressão, por hanseníase, dermatológicas e as ocasionadas por infecções cirúrgicas (DANTAS, D; TORRES; DANTAS, R., 2011). Estudo recente, ratificou que as úlceras venosas da perna, presentes especialmente em mulheres idosas, são consideradas as lesões mais prevalentes e de maior impacto na saúde pública, com custos elevados para os pacientes e gestão de saúde (PÉREZ *et al.*, 2018).

Feridas dos membros inferiores são relacionadas a uma taxa de mortalidade de 2,5%, elas representam um significativo problema para seus portadores, com prejuízo além de financeiro, na qualidade de vida dos mesmos; prejuízo também para o sistema de saúde e sociedade em geral, devido gastos e tempo de tratamento (SASANKA, 2012).

Além de ser um dos tipos mais encontrados de úlceras de membros inferiores, as úlceras de pé diabético, são propensas a evoluírem para amputação do membro afetado (NEVILLE *et al.*, 2016).

A terminologia Úlcera por Pressão foi alterada para Lesão por Pressão (LPP), anúncio este realizado pela *National Pressure Ulcer Advisory Panel* (NPUAP) em abril de 2016. Trata-se de uma lesão ocasionada pela pressão de forma intensa e/ou prolongada, associado ao cisalhamento, localizado na pele ou em partes moles, mais frequente em regiões de proeminências ósseas, ou mesmo ocasionada por dispositivo médico ou outro artefato (NPUAP, 2016). Em casas de repouso foram encontradas incidências deste tipo de lesão de 23,9% (BERGSTROM *et al.*, 1996), pode-se verificar o aumento deste índice quando comparado com os 4,5% apresentados em outro estudo mais antigo (MANLEY, 1978). A *National Pressure Ulcer Advisory Panel* estima que, nos Estados Unidos, mais de 1 milhão de pessoas hospitalizadas desenvolvem Lesões por Pressão por ano; aproximadamente 60.000 pessoas morrem anualmente por complicações decorrentes dessas úlceras. O custo do tratamento da Lesão por Pressão estimado nos Estados Unidos é de 2.000 a 25.000 dólares por indivíduo ao ano (AHCPR, 1992). Winkler (1990) demonstrou em sua pesquisa a incidência de 24% em unidades geriátricas ou ortopédicas durante períodos de internação de até três semanas. Unidades de terapia intensiva apresentaram 19,2% do total de pacientes com UP no hospital. Segundo Bours *et al.* (2001), a incidência de UP em UTI varia de 1% a 43%.

Desde os primórdios o homem demonstra preocupação com o cuidar de feridas, mas apenas no final da década de 50, surgiram os primeiros estudos sobre cicatrização de feridas em ambiente úmido. O conceito de cicatrização de ferida em meio úmido foi considerado pela primeira vez por George Winter em 1962 em um estudo com animais, no qual observou que a epitelização das feridas ocorreu duas vezes mais rápida nas feridas com cobertura, quando comparado ao efeito de manter o leito da ferida exposto (WINTER, 1962). Na década de 90, foram iniciados os primeiros trabalhos com curativos úmidos no Brasil, o que permitiu acesso a produtos específicos para o tratamento de feridas (FERREIRA; CALIL, 2001).

Muitos fatores podem determinar melhor ou pior condição para recuperação dos tecidos lesados, são classificados como fatores intrínsecos ou extrínsecos. Os fatores intrínsecos referem-se ao estado clínico do paciente, relaciona-se de forma negativa quando há presença de comorbidades como doenças crônicas, por exemplo diabetes, doenças cardiovasculares ou imunossupressoras, devido potencial de modificar o fluxo sanguíneo e o estado imunológico. Já os fatores extrínsecos, são aqueles relativos às características das feridas e ao tratamento ao qual é submetida, parte importante deste tratamento relaciona-se a utilização ou não de técnicas

corretas de assepsia e em especial à escolha dos produtos adequados para cobertura (TAZIMA *et al.*, 2008; OLIVEIRA, *et al.*, 2013).

Mesmo com os produtos para tratamento de feridas existentes nos dias de hoje, cerca de 25% a 50% de úlceras de membros inferiores permanecem sem cura completa até o sexto mês de tratamento (SINGER; TASSIOPOULOS; KIRSNER, 2017).

Ainda, conforme a região do mundo, podem ser escassos ou nulos os recursos para aceleração de cicatrização de feridas na pele. Desse modo, é importante ampliar os estudos que possibilitem o desenvolvimento de novos tratamentos para cura de feridas agudas ou crônicas (TROSTRUP *et al.*, 2018).

Um recurso utilizado pelas populações para tratamento de feridas é o uso de plantas medicinais, dentre as quais encontra-se presente a *Croton antispyhiliticus* (FENNER *et al.*, 2006; MORESKI *et al.*, 2018). Além de seu uso popular para cura de feridas, em estudo científico foi comprovada sua atividade anti-inflamatória em modelo *in vivo* (REIS *et al.*, 2014). Apesar disto, não existem estudos científicos que avaliem a atividade cicatrizante dessa planta. Visto isto, o presente trabalho teve como finalidade realizar estudo *in vivo* para avaliar a atividade cicatrizante de extrato etanólico da *Croton antispyhiliticus* na cicatrização de feridas em ratos.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

O presente trabalho tem por objetivo avaliar a atividade do extrato etanólico da *Croton antisiphiliticus* na cicatrização de feridas em ratos.

2.2 Específicos

- Avaliar o tempo de retração de feridas induzidas em ratos, tratados ou não com extrato etanólico da *Croton antisiphiliticus* em duas diferentes concentrações.
- Avaliar o processo de cicatrização, através da análise da angiogênese, proliferação de células mononucleares, proliferação fibroblástica, deposição de colágeno e re-epitelização das feridas induzidas em ratos, tratados ou não com extrato etanólico da *Croton antisiphiliticus* em duas diferentes concentrações.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Morfologia da pele

A primeira barreira que protege o corpo contra a agressão de agentes externos é a pele, manter sua integridade e função é de extrema importância para permanência da qualidade de vida e sobrevivência das pessoas (KOTTNER *et al.*, 2013).

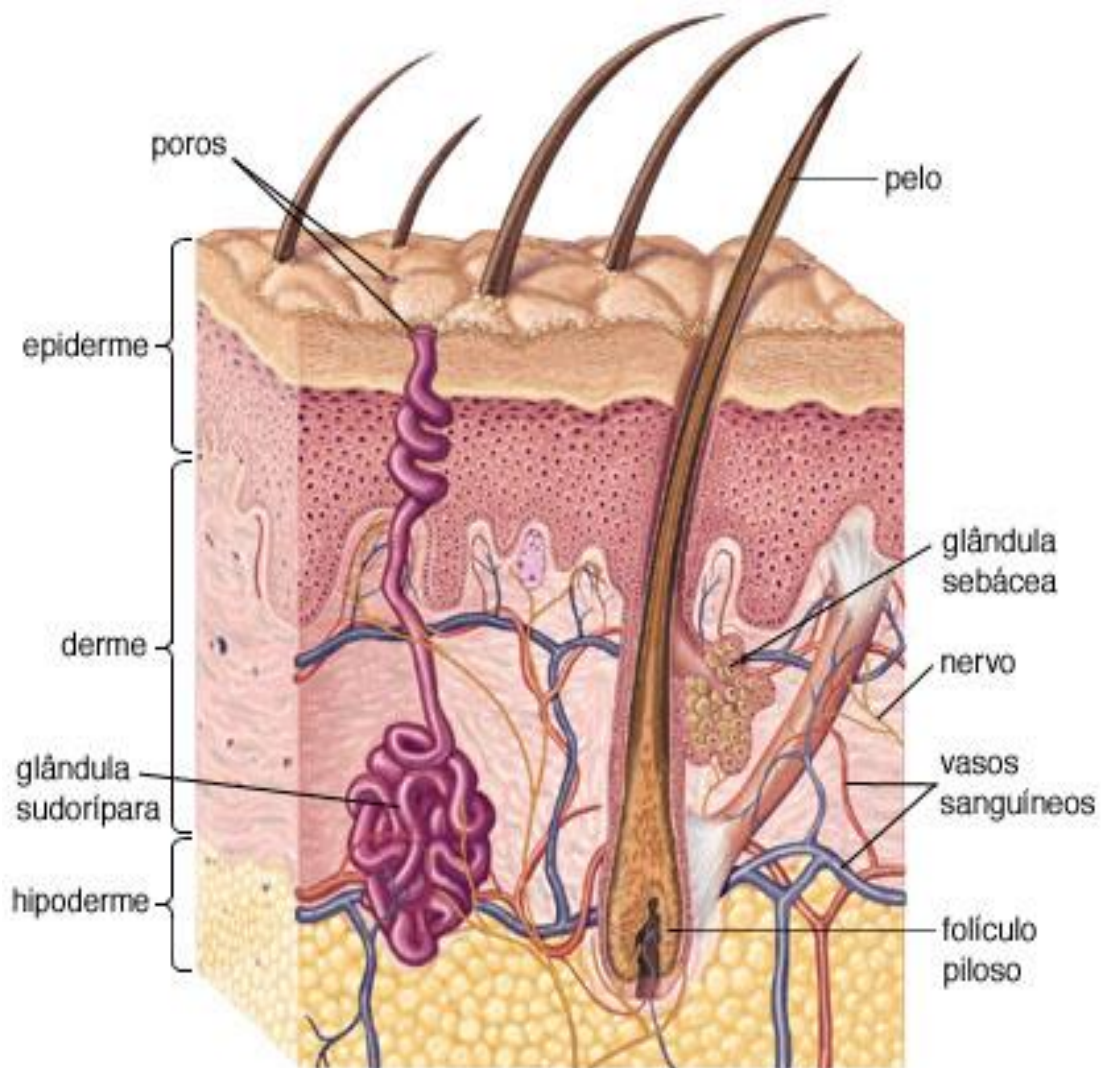
A pele, maior órgão do corpo humano, apresenta diversas funções, dentre elas a de combate ao atrito, desidratação, radiação ultravioleta, defesa contra microrganismos, percepção do tato e contribuição no processo de termorregulação (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2014).

É constituída por duas camadas, a epiderme e a derme. A epiderme é a primeira camada, localizada de forma mais externa. Conforme as diferentes regiões do corpo, a espessura da mesma pode ser maior ou menor. Apresenta epitélio pavimentoso estratificado queratinizado que se sobrepõem numa membrana basal avascularizada. Sua nutrição é realizada através da difusão, por meio dos vasos sanguíneos presentes na derme. Esta, constituída por denso tecido fibroso, fibras de colágeno, reticulares e elásticas que conferem resistência, firmeza e flexibilidade ao tecido; estão presentes também glândulas sudoríparas e sebáceas, vasos sanguíneos e linfáticos, terminações nervosas e os músculos eretores do pelo; por ser altamente vascularizada é a responsável pela nutrição e termorregulação da pele (SEELEY; STEPHENS; TATE, 2011).

A hipoderme, conhecida também por tecido subcutâneo, é uma camada mais profunda e espessa; não faz parte da pele por ser constituída por tecido conjuntivo frouxo e em maior quantidade por adipócitos que são responsáveis pelo isolamento e armazenamento térmico (SAHLE *et al.*, 2015).

A pele está sujeita a perda de sua integridade principalmente devido aos desgastes ocasionados pelo tempo que induz achatamento da epiderme e derme, diminuição da conexão entre queratinócitos, menor quantidade dos constituintes da derme, fibras colágenas mais rígidas e espessas e acúmulo de elastina, fibronectina, fibrilina e glicosaminoglicano. Dessa forma, indivíduos idosos tornam-se propensos ao desenvolvimento de feridas (MIURA; YAMASHITA, 2018).

Figura 1- Representação gráfica da anatomia da pele, adaptado da © 2010 Encyclopædia Britannica.



Fonte: Encyclopedia Britannica, 2010.

3.2 Ferida

As feridas são alterações ou rompimento do tecido epitelial decorrentes de danos físico-químicas, traumas ou doenças (FONDER *et al.*, 2008). De acordo com o tempo de cura, elas podem ser classificadas em agudas ou crônicas (DAI *et al.*, 2018).

Já em 1500 a.C. os antigos egípcios tratavam feridas com aplicação de mel, fato este identificado no Papiro *Ebers* (AUGUSTINE; KALARIKKAL; THOMAS, 2014). Tanto as feridas agudas quanto as crônicas são tidas como importantes problemas na saúde desde os primórdios; existem documentos do início da história com relato de tal fato (GEFEN; KOTTNER; SANTAMARIA, 2016).

3.2.1 Feridas agudas

As feridas agudas são ocasionadas principalmente por traumas na pele decorrentes de queimaduras, lacerações ou escoriações (PITTS *et al.*, 2008). Na população pediátrica com idade menor que 5 anos, é estipulado que as lesões ocorridas de forma mais frequente são as queimaduras (COFFELT; BAUER; CARROLL, 2013). O tempo de cicatrização de feridas agudas de acordo com Boateng *et al.*, (2008) varia de 8 a 12 semanas.

Essas lesões apresentam recuperação do seu tecido com a migração epitelial das bordas em conjunto com a contração do tecido de granulação; de forma a propiciar a aproximação de suas margens (SHARPE; MARTIN, 2013).

3.2.2 Feridas crônicas

As feridas se tornam crônicas devido presença e persistência de fatores agressores e destrutivos, elas permanecem estagnada na fase inflamatória do processo cicatricial. Há presença intensa e frequente de células inflamatórias (DIEGELMANN, 2003). Apresentam tempo de cicatrização maior que seis semanas ou manifestam recidivas constantes (NEVILLE *et al.*, 2005).

Dentre os fatores que impedem a cicatrização estão incluídos a inadequada vascularização do tecido, infecções, doenças crônicas como o diabetes, doenças cardiovasculares ou imunossupressora ou mesmo a realização de tratamento inadequado (NICKS *et al.*, 2010). O estresse oxidativo nas membranas celulares também pode contribuir para formação e evolução das feridas para nível crônico, isso decorre da capacidade fagocitária dos neutrófilos e macrófagos para com a bactérias o que gera elevada concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (MAYER *et al.*, 2018).

Um adequado tratamento de feridas crônicas é determinado pela interrupção dos fatores interferentes, como o controle de infecção e inflamação, desbridamento quando necessário, manutenção do leito da ferida úmido, além do uso de terapias complementares, para desta forma propiciar o avanço adequado das bordas das feridas (NICKS *et al.*, 2010; FRYKBERG e BANKS, 2015).

3.3 Cicatrização de feridas

Logo após o início da ferida na pele e em outros tecidos moles é iniciado o processo de reparo, ao qual se dá o nome de cicatrização (BHASKAR; NITHYA, 2012). A cicatrização da ferida é uma resposta fundamental à lesão tecidual, procede em uma sequência ordenada e resulta na formação de tecido estrutural e compatível de forma funcional com o tecido anterior à lesão, o que depende de energia e requer ambiente bioquímico apropriado, proteínas e matriz extracelular (YADAV *et al.*, 2014; SPEAR, 2013).

Uma cicatrização adequada depende de eventos que ocorrem de forma organizada e sequencial. Para que este processo seja harmonizado, são envolvidos vários tipos de células a fim de restabelecerem a homeostase, como plaquetas, células do sistema imunológico, fibroblastos, células endoteliais (OSTVAR *et al.*; 2015).

Estão incluídos no processo de recuperação de feridas também os fatores de crescimento, dentre os quais estão presentes o fator de crescimento derivado de plaqueta, que estimula a proliferação celular, a quimiotaxia e a síntese matricial; o fator epidérmico, que estimula a epitelização; o fator transformador alfa, responsável pela angiogênese e pela epitelização; o fator fibroblástico, que estimula a proliferação celular e angiogênese e o fator transformador beta, responsável pelo aumento da síntese matricial (CAMPOS; BORGES-BANCO; GROTH, 2007).

Fatores extrínsecos ou intrínsecos ao organismo influenciam a cicatrização, tornando-a inadequada, como má nutrição, tabagismo, uso de drogas, etilismo, isquemia, infecção, inflamação prolongada, técnicas cirúrgicas, presença de corpo estranho, edema e pressão tecidual elevada (CAMPOS; BORGES-BANCO; GROTH, 2007; NAGORI; SOLANKI, 2011).

Em 1910, Carrel, descreveu a organização dos eventos da cicatrização e os dividiu em cinco fases: inflamação, proliferação celular, formação do tecido de granulação, contração e remodelação da ferida. Já em meados de 1985, Clark realizou nova classificação, com divisão agora entre três fases utilizadas até a atualidade: fase inflamatória, proliferativa ou de granulação e de remodelação ou de maturação (CAMPOS; BORGES-BANCO; GROTH, 2007; BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005). Fases estas que se sobrepõem de forma contínua e temporal (SARMENTO *et al.*, 2014).

3.3.1. Fase inflamatória

Assim que um tecido é lesado é iniciada a primeira fase do processo cicatricial chamada de fase inflamatória, com sinais e sintomas clínicos de calor, rubor, dor e edema. Após o trauma, ocorre o extravasamento de sangue que proporciona ao local lesado inundação de seus componentes (MORESKI *et al*, 2018). Para que não haja perda sanguínea excessiva é iniciado o processo de vasoconstrição, que tende a parada do sangramento, aliado a tal processo está a presença da agregação plaquetária e de coágulos de fibrina que formam um trombo e ativam a cascata de coagulação. Como resultado desta junção é formada uma matriz provisória, base para o processo de cicatrização, que ocasiona a migração das células inflamatórias (MOURA, 2004).

As plaquetas após serem aderidas ao colágeno fibrilar ou a outras proteínas da matriz extracelular são ativadas e liberam pela degranulação o fibrinogênio, fibronectina, fator Von Willebrand e trombospondina, fatores estes pró-coagulantes (CARVALHO, 2002).

Citocinas pró-inflamatória e fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o fator de crescimento epitelial (EGF) e o fator de crescimento transformador beta (TGF- β) são secretados pelo coágulo formado e pelos tecidos em torno da ferida (FARIAS, 2014).

Após o controle do sangramento iniciada com a vasoconstrição passageira, segue-se com a vasodilatação que também favorece migração das células inflamatória para região da lesão devido aumento da permeabilidade vascular (CAMPOS; BORGES-BANCO; GROTH, 2007).

O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) possui propriedade quimiotática para células inflamatórias e regula o recrutamento delas para o local da lesão. Ele também possui efeito quimiotático e de mediação do recrutamento sobre os fibroblastos (LAWRENCE; DIEGELMANN, 1994)

Através do evento denominado de marginação leucocitária, ocorre a migração dos leucócitos da corrente sanguínea para o tecido endotelial, fenômeno este chamado de rolamento. Este processo é realizado de forma passiva através das paredes das vênulas (BRASILEIRO FILHO, 2016). Os neutrófilos são os primeiros leucócitos a chegarem à região da ferida, com função de fagocitar detritos celulares e destruir qualquer bactéria presente no local (CARVALHO, 2002). Todo processo de migração dos leucócitos depende da liberação de substâncias quimiotáticas, que são capazes de orientar o movimento de células através de um

gradiente de concentração. Macrófagos, mastócitos, eosinófilos, linfócitos e plasmócitos também são atraídos para o local da lesão (MOURA, 2004).

O influxo dos macrófagos derivados dos monócitos, que ocorre de forma consecutiva ao dos outros leucócitos, até a região da ferida, é de grande importância na indução dos mecanismos de reparo, eles se acumulam no local da ferida entre 2 a 5 dias após a lesão. Estas células colaboram com os neutrófilos na fagocitose de microrganismos e desbridamento tecidual, além de removerem os neutrófilos debilitados. Os macrófagos também são responsáveis pela liberação de fatores de crescimento e citocinas significativos na manutenção da resposta inflamatória e início, maturação e controle do processo cicatricial (CARVALHO, 2002).

Os fibroblastos do tecido conjuntivo das margens tornam-se ativados, proliferam, migram em direção ao coágulo em reabsorção e começam a sintetizar os componentes da matriz extracelular (BRASILEIRO FILHO, 2016).

O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento epitelial (EGF) e o fator de crescimento transformador beta (TGF- β) são os principais fatores de crescimento quimiotáticos para os macrófagos e fibroblastos na recuperação tecidual (CARVALHO, 2002).

Uma ferida limpa, onde não exista agentes microbianos, pode alcançar a máxima resposta inflamatória em 3 a 4 dias (BANKS, 1992).

3.3.2 Fase proliferativa

A fase proliferativa consiste no segundo estágio do processo cicatricial, é caracterizada pela re-epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno (LAWRENCE; DIEGELMANN, 1994).

A re-epitelização, ou seja, o recobrimento da ferida por um novo epitélio, ocorre a partir das células da camada basal, na qual, com presença de um tecido lesado, os queratinócitos iniciam o processo mitótico e proliferam em direção ao centro da ferida. Se a membrana basal também se encontrar lesada, as células epiteliais das bordas da ferida começam a se proliferar com a finalidade de restabelecer a barreira protetora (LAWRENCE; DIEGELMANN, 1994; MORESKI *et al.*, 2018).

A angiogênese configura-se como a formação de capilares, essencial para formação adequada do tecido cicatricial, caracteriza-se pela migração de células endoteliais. Possui o

fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) como principal estimulante (CAMPOS; BORGES-BANCO; GROTH, 2007). As células endoteliais dos capilares íntegros que são expostas através da membrana basal da parede vascular e das margens da ferida, usam a matriz extracelular como substrato para fazerem sua migração em direção ao leito da ferida; de forma subsequente, os capilares vão se diferenciar e formar novos tubos capilares; o broto capilar une-se ao capilar genitor, e assim restabelece o fluxo sanguíneo (BOGLIOLO FILHO, 2004).

Os fibroblastos, produtores de colágeno, sob estímulo de fatores de crescimento e quimiotáticos, em especial o PDGF, liberados pelas plaquetas e macrófago, são ativados e migram de forma intensa das margens das feridas e são induzidos a sintetizar esta proteína, processo conhecido como fibroplasia (WITTE; BARBUL, 1997; CARVALHO, 2002; MANDELBAUM, S.; DI SANTIS; MANDELBAUM, M., 2003). O tecido de granulação apresenta um tecido edematoso constituído por vasos imaturos e frágeis, tecido conjuntivo frouxo, com presença de leucócitos e matriz extracelular formada por fibras colágenas finas, glicosaminoglicanas, fibronectina, ácido hialurônico e moderada quantidade de proteoglicanos (BRASILEIRO FILHO, 2016; MANDELBAUM, S.; DI SANTIS; MANDELBAUM, M., 2003; 2003; MORESKI *et al*, 2018).

Com o avançar do processo de maturação, os proteoglicanos e as fibronectinas são substituídos cada vez mais pelo colágeno, a fim de proporcionar melhor qualidade estrutural ao tecido cicatricial, além de ocorrer a diminuição dos fibroblastos e conteúdos das glicoproteínas e mucopolissacarídeos (MOURA, 2004).

Alguns fibroblastos diferenciam-se em miofibroblastos, responsáveis pela contração da ferida e de forma consequente aproximar suas bordas (WITTE; BARBUL, 1997; MOURA, 2004).

3.3.3 Fase de maturação ou remodelamento

Esta fase do reparo tecidual envolve de forma contínua a produção, agregação e orientação das fibrilas e fibras colágenas. O processo de remodelagem é responsável pelo aumento da força de tração, com deposição de colágeno de maneira organizada e a substituição do colágeno tipo III, mais fino e com orientação paralela à pele, pelo colágeno tipo I, mais espesso e organizado ao longo das linhas de tensão (SLATTER, 1998).

Fibroblastos e leucócitos secretam collagenases que promovem a lise da matriz antiga. No decorrer deste processo ocorre a atividade celular e o número de vasos sanguíneos são

reduzidos, assim como o número de fibroblastos, o que leva à maturação cicatricial (SLATTER, 1998). O tecido cicatrizado começa a apresentar os anexos da pele, como os folículos pilosos e glândulas, ao final desta fase (MORESKI *et al.*, 2018).

Considera-se a cicatrização como adequada, quando há equilíbrio entre a síntese da nova matriz e a lise da matriz antiga. (CAMPOS; BORGES-BANCO; GROTH, 2007).

O tempo total para um processo de cicatrização completo e ótimo depende diretamente da taxa de disponibilidade das substâncias bioquímicas necessário para que cada mecanismo e fenômeno ocorram (UDEGBUNAM *et al.*, 2014).

3.4 Plantas medicinais

Para se obter sucesso na recuperação de uma ferida é necessário escolha da substância adequada para agir em cada uma de suas etapas (SARMENTO *et al.*, 2014). O tratamento das feridas tem como principais objetivos curar a lesão no menor tempo possível com o mínimo de dor e desconforto para o paciente (YADAV *et al.*, 2014). Os tratamentos tópicos de feridas abertas vêm sendo estudados desde a antiguidade e apresentam grandes avanços; tem como finalidade proteger a lesão e favorecer a cicatrização (CAPELLA *et al.*, 2016).

Uma das formas utilizadas para tratamento de feridas pela população é o uso de produtos naturais; apesar do predomínio de substâncias sintéticas para uso local e sistêmico no tratamento de feridas, observa-se crescente interesse por alternativas naturalistas, como o uso de plantas medicinais, que promovam a cicatrização das lesões; vários são os estudos atuais sobre ação das partes das plantas no processo cicatricial (MORESKI *et al.*, 2018).

As plantas estudadas como potenciais cicatrizantes possuem princípios ativos como triterpenos, alcalóides, flavonóides e biomoléculas e podem influenciar em uma ou mais fases do processo de cicatrização (PONRASU; SUGUNA, 2012).

O Brasil possui muitas espécies de plantas com potencial farmacológico devido sua ampla biodiversidade, o que se configura como uma importante fonte para a descoberta de novos princípios ativos (BATISTA *et al.*, 2016). Porém, apenas 10% das 120.000 espécies aproximadamente existentes foram estudadas do ponto de vista fitoquímico e biológico (SARMENTO *et al.*, 2014).

Durante séculos, o uso das plantas como medicamento terapêutico para diversos acometimentos de saúde, configurou-se como a única alternativa ao homem (ALVES, 2013). Devido à inexistência de estudos científicos para a maioria das plantas nativas no Brasil, a

utilização empírica das mesmas em diversos tipos de enfermidades é comum, por serem elementos naturais e uma alternativa de baixo custo e de fácil acesso à população; são utilizadas plantas com base em conhecimento próprio ou por sugestão de familiares, vizinhos e amigos (BRUNING; MOSEGUI; VIANA, 2012; FIGUEREDO; GURGEL; GURGEL JUNIOR, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2014).

A população muitas vezes busca tratamento com plantas medicinais devido ao elevado custo dos medicamentos sintéticos e pelo fato destes nem sempre proporcionarem resultados satisfatórios, além da busca de formas alternativas de tratamento menos agressivos e pela crença de que apresentam menos efeitos adversos (BRUNING; MOSEGUI; VIANA, 2012; FIGUEREDO; GURGEL; GURGEL JUNIOR, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2014).

3.4.1 Gênero *Croton*

O Brasil possui vasta flora, abriga mais de 45.000 espécies de plantas, que representam cerca de 10% do total encontrado em todo o mundo (BFG, 2015; BRASIL, 2016). A mata atlântica e o cerrado são conhecidos por suas altas taxas de biodiversidade e níveis de endemismo, porém se encontram sob riscos críticos de degradação em consequência da expansão da agricultura e atividades de pastoreio, bem como a mineração não planejada (NEPSTAD *et al.*, 2014; MÜGGE *et al.*, 2016). O estudo destes biomas ameaçados é importante para conservação da biodiversidade e, por conseguinte de substâncias com propriedades farmacológicas que podem ser isoladas destes produtos naturais e ser fontes de novos medicamentos (ALVES; POVH, 2013; FERNANDES *et al.*, 2013).

O gênero *Croton* é o segundo maior gênero da Família Euphorbiaceae, sendo que nas Américas e no Brasil é o gênero mais diversificado dessa Família; possui distribuição pantropical com cerca de 1.300 espécies de ervas, subarbustos, arbustos e árvores; aproximadamente 28% delas são encontradas no Brasil (BERRY *et al.*, 2005; VAN EE *et al.*, 2011; REIS, 2013).

A diversidade no uso medicinal de espécies da *Croton* nas diferentes regiões do mundo é proporcional a toda variabilidade encontrada neste gênero. Tendo-se em vista a variedade de usos na medicina popular tradicional ou terapias alopáticas é importante a realização de estudos sobre o potencial farmacológico dos extratos ou componentes isolados das espécies de *Croton* (MATOS, 2011). Para o tratamento de uma diversidade de afecções já foram realizados estudos farmacológicos e químicos de extratos e compostos isolados de espécies desse gênero. É demonstrada ampla ação terapêutica com ênfase nas funções como antidiabético,

antirreumático, combate ao colesterol alto, antidiarreico, imunomodulador, atividades antibacteriana, antifúngica, antiviral e anti-inflamatória, atuação em problemas gastrointestinais, leucemia, úlceras, obesidade, anorexia, hepatite, problemas respiratórios, analgésico e até mesmo adoçante (SALATINO, A.; SALATINO, M.; NEGRI, 2007; SÁ *et al.*, 2012).

Sua composição química é variada (CARVALHO, 2013), as descobertas de novas estruturas como por exemplo de novas classes de diterpenos e alcalóides é refletida pela diversidade do gênero (HELUANI *et al.*, 2000; ARAÚJO JUNIOR *et al.*, 2005). As funções inerentes a este gênero são atribuídas a várias classes de compostos, tais como óleo volátil, alcalóide, proantocianidina, flavonóides e principalmente ésteres diterpenoides como forbols, clerodanos, labdanos, cauranos e trachylobanos (SALATINO, A.; SALATINO, M.; NEGRI, 2007; MATOS, 2011; SÁ *et al.*, 2012).

A distribuição geográfica das espécies de *Croton* podem determinar sua composição química. Algumas características já foram definidas, como por exemplo a ocorrência de diterpenos clerodanos em espécies de todos os continentes e que cauranos e labdanos ainda não foram relatados para espécies do ocidente. Outro padrão observado é que alcalóides foram identificados somente em espécies das Américas, onde também é observado a maior parte das espécies aromáticas. A elucidação de alguns aspectos da complexa filogenia do gênero pode vir da combinação de dados químicos, geográficos e moleculares (MATOS, 2011).

Os diterpenos são uma classe dessas substâncias já reconhecidos para uma ampla gama de propriedades farmacológicas, tais como anti-inflamatório, anti-ulcerativo, atividades antiviral, citotóxica, antimicrobiana, gastroprotetora e analgésica (OLIVEIRA *et al.*, 2011; PREMPRASERT *et al.*, 2012).

3.4.1.1 *Croton antisyphiliticus*

Uma das espécies do gênero *Croton* é a *Croton antisyphiliticus*, uma planta arbustiva, encontrada principalmente nos estados brasileiros que contêm vegetações típicas do cerrado, principalmente o estado de Minas Gerais. É conhecida popularmente como canela-de-perdiz, curraleira, pé-de-perdiz ou alcanforeira (HIRSCHMANN; ARIAS 1990; RODRIGUES; CARVALHO, 2001; BRANDAO *et al.* 2012; VILA VERDE *et al.* 2003; MATOS, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2011; ALVES, 2013; REIS, 2013; SODRÉ; SILVA, 2015; SOUZA *et al.*, 2016).

Figura 2. Partes aéreas (inflorescências, folhas e caule) da *Croton antisiphiliticus*



Fonte: Arquivo pessoal dos pesquisadores.

Estudos sobre o uso da *Croton antisiphiliticus* pela população identificaram que são utilizadas as raízes e folhas para produção de chás, vinho medicinal e garrafadas; utilizadas pela população no tratamento de sífilis, lesões ulcerativas, eczemas, reumatismos, cólicas, infecções uterinas, além da ação anti-inflamatória (ALVES, 2013; CAVÉCHIA; PROENÇA, 2007; REIS, 2013; VILA VERDE *et al.*, 2003; HIRSCHMANN; ARIAS, 1990; RODRIGUES; CARVALHO, 2001; BOTREL *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2007; MOREIRA; GUARIMNETO, 2009; NADER *et al.* 2010; SODRÉ; SILVA, 2015; BRANDAO *et al.* 2012;). São relatados também a utilização desta espécie como estimulante, sudorífica, antirreumática, diurética, cicatrizante e para o tratamento contra picadas de cobras (PIO-CORREA, 1974).

Um levantamento etnobotânico sobre o uso de plantas medicinais, detectou que a *Croton antisiphiliticus* Mart. (Euphorbiaceae) encontra-se dentre as plantas medicinais do cerrado mais utilizadas pela população da cidade de Mossâmedes, estado de Goiás, localizada nas proximidades da Reserva Biológica da Serra Dourada/GO. Utilizam de decocção e garrafadas de suas raízes e folhas para ação terapêutica anti-sifilítica, anti-inflamatória e antirreumática (VILA VERDE *et al.*, 2003).

Em revisão sobre as plantas medicinais do Brasil, foram reportados trabalhos que citam o uso da *Croton antisiphiliticus* desde o século XIX para a cura de feridas e úlceras (FENNER *et al.*, 2006).

Essa espécie foi citada pelos entrevistados da Comunidade de Santa Rita, Ituiutaba-MG, como espécie medicinal para tratamento de infecções uterinas utilizando das raízes em vinho medicinal e decocção (ALVES, 2013).

Em cidade do interior de Goiás, a *Croton antisiphiliticus* foi a espécie com maior valor de uso relatado por raizeiros, com a utilização na forma de garrafada e decocto como depurativo, para tratamento de úlceras no estômago, DST/sífilis e erupções na pele. É a espécie mais versátil em relação aos sistemas corporais, com ação nos sistemas circulatório, digestivo, reprodutivo e tegumentar (SOUZA *et al.*, 2016).

As folhas desta espécie são usadas de forma popular para tratar feridas e picadas de cobra, como diurético e antissifilítico (BRANDÃO, 2012; MÜGGE *et al.*, 2016).

Segundo dados etnofarmacológicos, o extrato hidroalcoólico das raízes é utilizado no tratamento de algumas doenças sexualmente transmissíveis e de infecções do sistema reprodutor feminino e masculino (BARROS, 1982; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

É sugerido potencial para atividade antifúngica da *Croton antisiphiliticus* (FENNER *et al.*, 2006). Foi identificada ação nematocida do extrato etanólico da espécie (SLOMP *et al.*, 2009), além de atividades anti-inflamatória e citotóxica (FERNANDES *et al.*, 2013; REIS *et al.*, 2014).

Informações adquiridas sobre a *Croton antisiphiliticus* em um tempo em que a vegetação nativa no Brasil ainda estava preservada e o uso das plantas era feito principalmente a partir de espécies da flora autóctone a definiu como uma espécie de uso medicinal que necessita ser submetida a estudos de eficácia e segurança antes de sua distribuição comercial o que exige tempo e investimentos (MÜGGE *et al.*, 2016).

Apesar dos demonstrados usos populares da espécie *Croton antisiphiliticus*, os valores medicinais desta planta referentes à cicatrização de feridas mantem-se de forma empírica. É fundamental o estabelecimento da segurança, eficácia e garantia de qualidade das preparações. Com a realização de estudos pré-clínicos e clínicos sobre as plantas medicinais, sua eficácia e segurança serão comprovadas através de estudos científicos e não apenas pelo conhecimento popular (FIGUEREDO; GURGEL; GURGEL JUNIOR, 2014).

Em relação à sua caracterização química a *Croton antisiphiliticus* é a espécie do gênero *Croton* que apresentou menor quantidade e diversidade de componentes dos óleos voláteis extraídos de suas folhas e caules. Os usos medicinais relatados para esta planta não devem estar relacionados com componentes voláteis (MATOS, 2011).

Fernandes *et al.* (2013) investigaram pela primeira vez a atividade citotóxica do epímero diterpênico de ácido caurenóico (EKA) isolado da *Croton antisiphiliticus* para linhagens de

células tumorais HeLa e B-16 e fibroblastos normais 3T3, que exibiu atividade citotóxica moderada contra um câncer cervical e de melanoma. Com o trabalho, concluíram que o EKA não é seletivo entre linhas celulares tumorais e normais; o EKA induz apoptose, que faz parte do mecanismo inato da célula de defesa contra neoplasia.

Dentre os estudos publicados sobre as propriedades farmacológicas da *Croton antisiphiliticus* encontra-se o de Pereira *et al.* (2012) que focou na atividade antimicrobiana contra o *Staphylococcus aureus*, ao utilizar para a pesquisa o composto chamado ácido ent-kaur-16-en-18-oic que foi isolado de extrato clorofórmico da raiz desta planta. Outro estudo demonstrou em ensaio *in vitro* o efeito anti-inflamatório de extrato da *Croton antisiphiliticus* pela inibição da 5-lipoxigenase (BRAGA *et al.*, 2000).

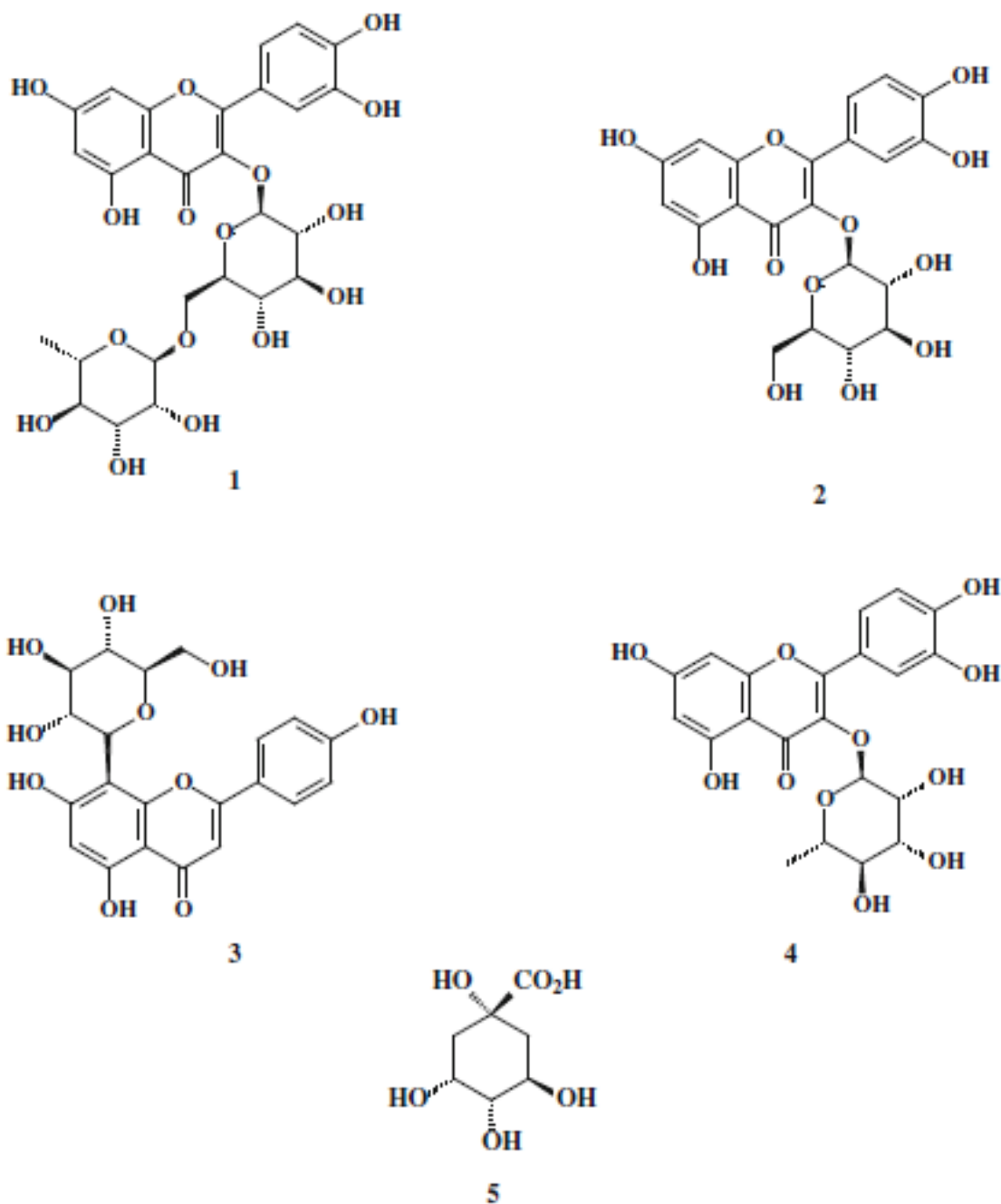
Reis *et al.* (2014) demonstraram pela primeira vez, o efeito anti-inflamatório da *Croton antisiphiliticus* em modelo experimental *in vivo*, ao serem realizados testes de resposta inflamatória à pleurisia induzida por carragenina em camundongos. Tal efeito se deve pela inibição de enzimas pró-inflamatórias, citocinas e células e sugerem que este efeito possa estar associado à presença de compostos específicos tais como vitexina e ácido quínico. Este estudo proporcionou uma base científica para o uso desta planta na medicina popular.

Na caracterização química do extrato etanólico da espécie foram encontrados flavonóis e taninos; alcalóides e cumarinas não foram detectados (SLOMP *et al.*, 2009). Em sua composição geral foi possível identificar de forma mais abundante em caules e folhas por exemplo, a quercitrina, um glicosídeo do flavonol quercetina, com propriedade antioxidante, anti-inflamatória, antileishmanicida e antidiarreica (UPPUNGUNDLA *et al.*, 2009; BABUJANARTHANAM *et al.*, 2010; CAMUESCO *et al.*, 2004; MUZITANO *et al.*, 2006; GALVEZ *et al.*, 1993).

Em outra análise do extrato bruto etanólico, observou-se, principalmente nas folhas, grande diversidade de esteróides e triterpenos (campesterol, estigmasterol, sitosterol, α -amirina, β -amirina, estigmast-4-en-3-ona) e ésteres metílicos de ácidos graxos; foi sugerido que flavonóis e outras substâncias também podiam estar presentes no extrato porém em quantidades muito mais baixas em relação aos demais componentes identificados (MATOS, 2011).

Uma análise fitoquímica de *Croton antisiphiliticus* mostrou a presença de quatro flavonoides glicosilados e o ácido quínico (Figura 3) (REIS *et al.*, 2014).

Figura 3. Estrutura química dos constituintes da *Croton antisiphiliticus*.



Fonte: Reis *et al.*, 2014.

Legenda: 1 Rutina, 2 isoquercitrina, 3 vitexina, 4 quercitrina e 5 ácido quínico.

Uma análise eletroforética capilar do extrato bruto hidroalcoólico mostrou a presença dos flavonóides *O*-glicosídeo rutina, isoquercitrina e quercitrina e o flavonóide C-glicosídeo vitexina (REIS *et al.*, 2014).

Com uma ampla distribuição dessa espécie nos cerrados brasileiros, principalmente em Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e São Paulo, e o reconhecimento do uso

medicinal por populações tradicionais, um estudo mais detalhado em busca de substâncias farmacologicamente ativas poderá se revelar gratificante (MATOS, 2011).

Visto o uso popular da *Croton antisiphiliticus* para cura de feridas e sua caracterização química que já determinou presença de componentes com atividades anti-inflamatórias e cicatrizantes, neste trabalho foi examinado a eficácia da aplicação tópica de solução etanólica do extrato de folhas da *Croton antisiphiliticus* no processo de reparação de feridas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O Estudo foi realizado no Laboratório de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha (LPP-UFVJM) e Mucuri (UFVJM). Foram utilizados também o Laboratório de secagem e estudos alelopáticos do Departamento de Farmácia da UFVJM e o Laboratório de Patologia do Departamento de Odontologia da UFVJM.

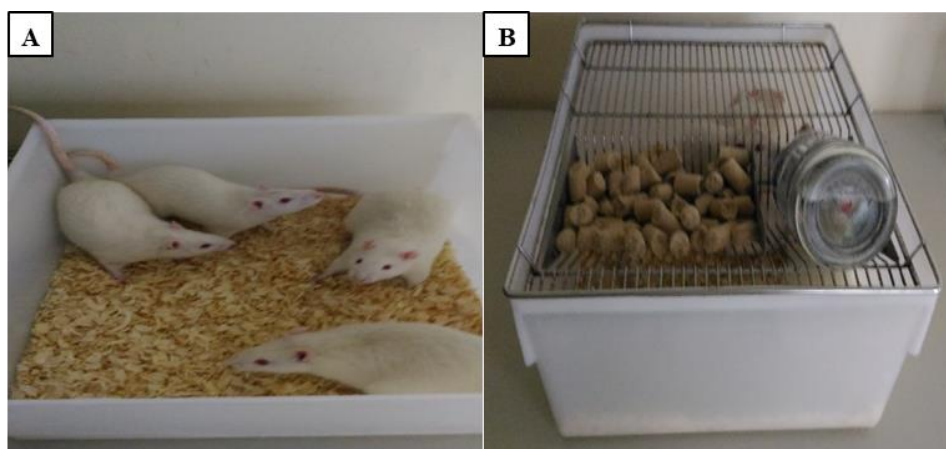
4.1 Animais

Foram utilizados 07 ratos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar, machos, adultos, com variação de peso de 295 a 345g, provenientes da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A presente pesquisa utilizou quantidade mínima de animais necessários para se obter resultados estatisticamente válidos conforme estudos prévios realizados e o que é estipulado no modelo dos Três R's (redução, refinamento e substituição) o qual visa suprir desvantagens associadas com experimentos com animais e evitar procedimentos antiéticos (DOKE; DHAWALE, 2015).

O trabalho foi realizado após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (CEUA- UFVJM) sob o protocolo de número 014/2017. Todos os procedimentos experimentais realizados seguiram as recomendações nacionais impostas pela Lei Arouca (11.794/2008) (BRASIL, 2008).

Os animais foram mantidos em biotério de experimentação do Laboratório de Pesquisa e Pós-Graduação na Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Campus JK. Conforme orientações da Resolução Normativa CONCEA nº 15, de 16 de dezembro de 2013 (2013), foram mantidos em caixas de polietileno com 148,35cm² e 17,8 cm de altura, com acesso à ração para roedores e água *ad libitum*, em salas climatizadas com temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ$), com sistema de exaustão, ausência de vibrações, ruídos mínimos e em fotoperíodo de 12 horas de claro e escuro. Foram realizadas estratégias a fim de minimizar a dor, sofrimento e estresse causados durante o experimento, como a analgesia, o que beneficia também a qualidade da pesquisa (DOKE; DHAWALE, 2015). As caixas de polietileno foram forradas com maravalha de pinus, as trocas e higienização foram realizadas três vezes por semana.

Figura 4. Manutenção dos animais. A) Acomodação dos animais em caixa de polietileno. B) Alimentação dos animais com livre demanda de água e ração.



Fonte: Arquivo pessoal dos pesquisadores

O acesso à sala de manutenção dos animais ocorreu apenas para trocas e limpeza das caixas, permanecendo fechado nas demais ocasiões. Os procedimentos experimentais, inclusive a eutanásia, ocorreram em sala extra à de locação dos animais. À realização de tais procedimentos, os locais que os receberam foram limpos e os animais levados um a um.

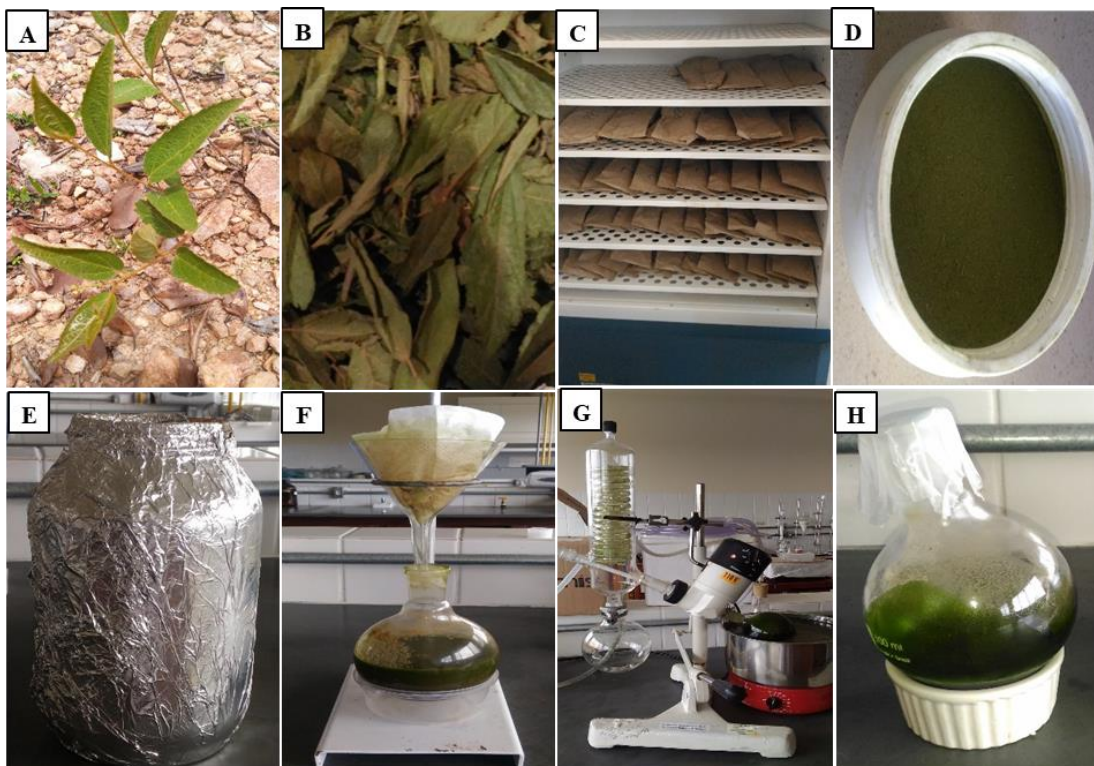
4.2 Produção do extrato

O material vegetal, constituído de folhas da *Croton antisiphiliticus* foi colhido em área de cerrado na cidade de São Gonçalo do Rio Preto, localizada no Vale do Jequitinhonha em Minas Gerais. Uma exsicata se encontra depositada no herbário da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), sob o N° HDJF 4639.

As partes aéreas de *Croton antisiphiliticus* foram secas em estufa CIENLAB com circulação de ar a 40°C. Em seguida, para extração, as partes aéreas secas e maceradas foram colocadas em contato com o álcool etílico absoluto 99,8% PA em um frasco de vidro na proporção de 1:4 de vegetal e álcool respectivamente, à temperatura ambiente. Foi realizada homogeneização diária do macerado com o álcool. Após 05 dias, o extrato etanólico obtido foi filtrado em papel filtro Melitta®; logo após, a solução filtrada foi colocada em um evaporador rotativo sob pressão reduzida a 50 °C para remoção do solvente. Este procedimento foi repetido por 6 vezes com intervalo de 5 dias, a fim de se obter o rendimento máximo do extrato bruto etanólico da *Croton antisiphiliticus* (EBE-Ca). Após o procedimento o EBE-Ca obtido foi

mantido em refrigeração para secagem. Quando estabilizado o peso da amostra do extrato, o mesmo foi considerado apto para ser incorporado ao gel.

Figura 5. Processo de preparo do EBE-Ca.



Legenda: EBE-Ca= extrato bruto etanólico da *Croton antisiphiliticus*. A) *Croton antisiphiliticus* em meio natural. B) Folhas da *Croton antisiphiliticus* colhidas e secas em ar ambiente. C) Folhas dentro de envelope na estufa para secagem. D) Folhas maceradas. E) Frasco com macerado em contato com álcool etílico absoluto 99,8%. F) Filtragem da solução. G) Solução em evaporador rotativo. H) Extrato após eliminação do solvente. Fonte: Arquivo pessoal dos pesquisadores.

4.3 Produção do gel

O gel utilizado foi o Carbopol. Foram produzidos e utilizados apenas o gel, o gel com o extrato a 5% e o gel com extrato a 10%, concentrações estas definidas conforme estudos prévios (ABDULLA *et al.*, 2009; AL-BAYATY *et al.*, 2010; BHASKAR; NITHYA, 2012; UDEGBUNAM *et al.*, 2015).

Para produção 400g do gel de Carbopol foram utilizados carbopol 1,5% (Carbomer 940, marca Pharma Special®), nipagin 0,1% (Nipagin Purissimo, marca Isofar®), nipazol 0,05% (Nipazol P.A., marca Dinâmica reagentes analíticos®), tretanolamina pH 7 (Trietanolamina

P.A., marca Vetec®), água destilada e propilenoglicol 5% (Propileno Glicol P.A. [1,2 Propanodiol], marca Vetec®). Foram dissolvidos o Nipagin e o Nipazol em propilenoglicol, acrescentado água aquecida e dispensado o Carbopol, realizada neutralização com trietanolamina até gelificação total e completado o peso com água destilada.

Foram produzidos 100g de cada gel utilizado no experimento (apenas o gel de carbopol, o gel com 5% do EBE-Ca e gel com 10% de EBE-Ca). Para formulação de 100g do gel foi acrescentado 10ml de água em 90g do gel preparado; para o gel com 5% do EBE-Ca foi acrescentado 5g do extrato em 05 ml de água destilada e posteriormente em 90g do gel e para o gel com 10% do EBE-Ca foi acrescentado 10g do extrato a 90g do gel.

4.4 Delineamento experimental

Inicialmente, os ratos foram pesados e permaneceram por sete dias adaptando-se ao ambiente no qual foram acondicionados.

Em cada animal foram produzidas 4 feridas mecânicas paravertebrais e submetida cada uma a diferentes tratamentos, modelo este adaptado dos estudos realizados por Sarmento *et al.* (2014) e Karakas *et al.* (2012). A primeira ferida não recebeu tratamento sendo denominada sem tratamento (ST), a segunda ferida foi tratada apenas com o veículo, sendo o gel de carbopol (G), a terceira ferida foi tratada com o gel associado ao extrato etanólico da *Croton antisiphiliticus* 5% (G5%); e a quarta ferida foi tratada com o gel associado ao extrato etanólico da *Croton antisiphiliticus* 10% (G10%).

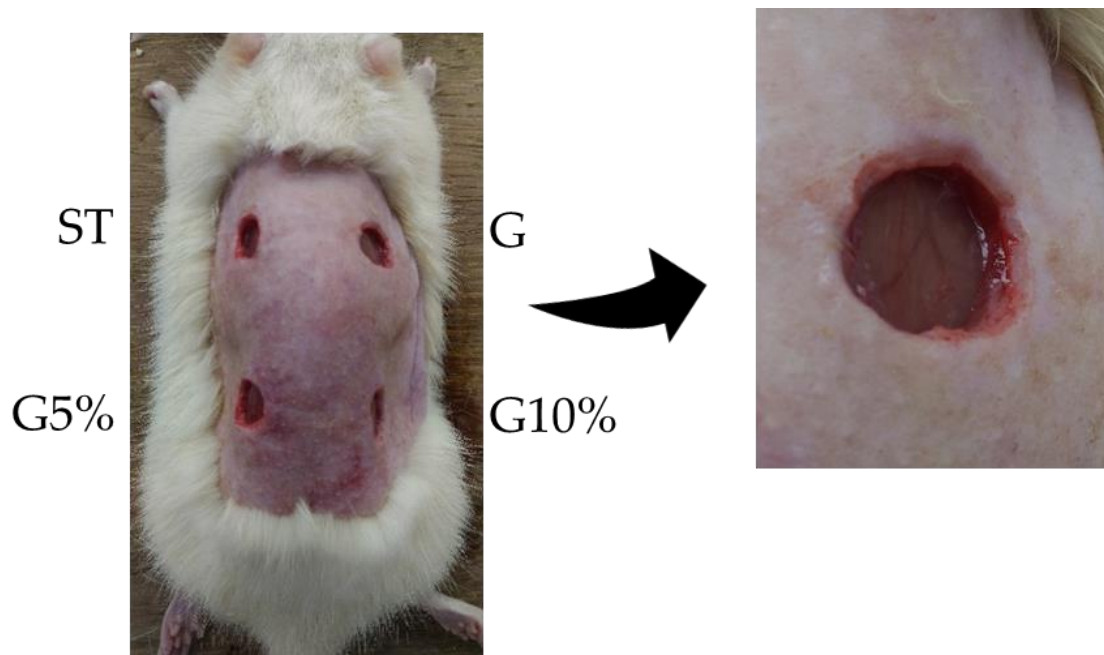
Para realização do procedimento, os animais foram anestesiados com solução via intraperitoneal de ketamina (80mg/Kg) e xilazina (10mg/Kg). Após anestesia, foi realizada a depilação da região dorsal de forma manual, pelo fato de que a tração manual dos pelos dificilmente causa lesões na pele, ao contrário do que acontece com o uso de aparelhos laminados (GARROS *et al.*, 2006).

Em seguida, foram realizadas quatro feridas excisionais circulares paravertebrais de 10 mm de diâmetro em cada animal com tesoura cirúrgica até exposição da fáscia muscular. Após o procedimento os animais eram medicados com dipirona, gotejada na água de consumo.

Os tratamentos das feridas foram realizados uma vez ao dia a partir do dia do procedimento cirúrgico. Foram mensuradas as áreas das lesões no dia da indução, no primeiro dia de pós-operatório e posteriormente a cada dois dias e por último no 28º dia do

acompanhamento. Os animais foram pesados uma vez por semana, do início ao final do experimento.

Figura 6. Feridas paravertebrais após o ato operatório, com 10mm de diâmetro e exposição da fáscia muscular.



Fonte: Arquivo pessoal dos pesquisadores.

No 28º dia do protocolo experimental, os animais foram submetidos à eutanásia com administração via intraperitoneal de solução de ketamina (240mg/Kg) (Dopalen®, marca Ceva) e xilazina (30mg/Kg) (Anasedan®, marca Ceva). Após a eutanásia foram coletadas amostra do tecido cicatricial de cada lesão e uma amostra de tecido íntegro, sendo esta coletada da região central do dorso do animal.

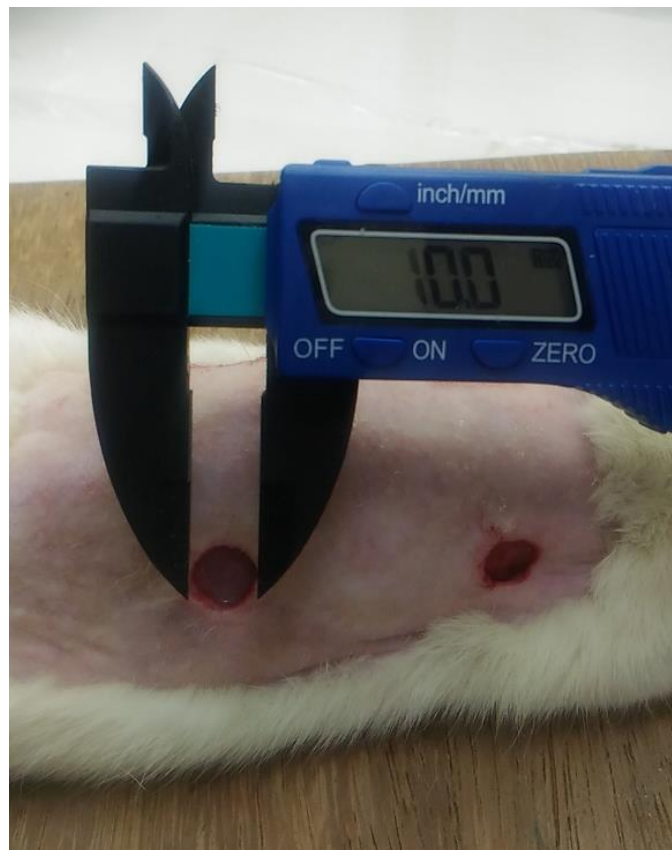
Como a inflamação é parte do processo cicatricial, os medicamentos utilizados nesta pesquisa, não apresentam atividade anti-inflamatória (BEHEREGARAY *et al.*, 2014).

Para investigação do resultado experimental foi avaliado o período de retração das feridas e avaliação histológica de amostras dos tecidos cicatriciais coletados ao final do último dia de acompanhamento dos animais, com análise da angiogênese, células mononucleares, proliferação fibroblástica, re-epitelização e colagenização.

4.5 Avaliação macroscópica

Por um período de 28 dias, iniciado após indução das feridas, foi observada diariamente a clínica das lesões quanto a presença de efeitos adversos e irritação perilesional, além da cobertura com os respectivos tratamentos. No dia do procedimento cirúrgico, no primeiro dia do pós-operatório e em seguida a cada dois dias, as lesões tiveram o tamanho medido em duas direções, o maior comprimento pela menor largura, com auxílio de paquímetro digital e posteriormente mensurada a área e avaliada a retração da ferida.

Figura 7. Medição da ferida com paquímetro digital após o procedimento operatório.



Fonte: Arquivo pessoal dos pesquisadores.

A porcentagem de retração das feridas foi calculada pela fórmula dada:

$$\% \text{ de retração da ferida} = \frac{\text{área da ferida no dia da excisão} - \text{Área da ferida no dia } n}{\text{área da ferida no dia da excisão}} \times 100,$$

onde n é igual ao número de dias (TRESVENZOL *et al.*, 2013; FIKRU *et al.*, 2012; MEKONNEN *et al.*, 2013; YADAV *et al.*, 2014; MAURYA; SEMWAL; DUBEY, 2016).

Durante o experimento, nenhum agente antimicrobiano local ou sistêmico foi utilizado nos animais enquanto as feridas estavam submetidas aos tratamentos.

4.6 Processamento histológico

Após a eutanásia dos animais foram coletadas amostras dos tecidos cicatriciais das feridas ST, G, G5%, G10%, além de uma amostra do tecido íntegro (TI) coletada da região central do dorso dos ratos. Estes tecidos foram mantidos em formol 10% até o início da montagem das lâminas (SANTOS *et al.*, 2014).

Os tecidos foram acomodados em cassetes identificados, em seguida mantidos em álcool 70%. Para seguir com a desidratação as amostras foram retiradas do álcool 70% no dia seguinte e passadas para o primeiro frasco com álcool 95%, onde permaneceram por uma hora, após 30 minutos foram passadas para o segundo frasco com álcool a 95%. Após uma hora, foram retiradas do álcool 95% e passadas para um primeiro frasco com álcool absoluto, onde permaneceram por 01 hora, seguindo para o segundo frasco com álcool absoluto após 30 minutos, foram removidas para diafanização em um primeiro frasco com xilol puro, onde permaneceram por 30 minutos, em seguida, transferidos para segundo frasco com xilol puro, após 30 minutos foram retirados do xilol e passado para o frasco com parafina líquida dentro da estufa. Neste primeiro recipiente com parafina, no qual os cassetes permaneceram por 02 horas, foi dado início a impregnação; em seguida, foram passados para segundo recipiente com parafina, onde permaneceram por mais 20 minutos. A seguir, as amostras foram retiradas da parafina e colocadas em moldes com parafina para a inclusão e adaptado a um lado do cassete, em seguida colocados em refrigerador para adquirir rigidez. Quando congeladas, as amostras em parafina foram retiradas dos moldes e mantidas adaptadas ao cassete (MOURA, 2004; MOLINARO; CAPUTO; AMENDOEIRA, 2010; SANTOS *et al.*, 2014).

Foram realizados cortes de 5 μ m das amostras dos tecidos cicatriciais com micrótomo manual, realizadas três lâminas de cada amostra, uma para coração com hematoxilina-eosina, uma para coração com Tricômico de Masson e uma para reserva, em cada lâmina foram inseridos dois cortes de amostras do tecido (GARROS *et al.* 2006; FREITAS *et al.*, 2013). As mesmas foram colocadas em blocos com distanciamento entre elas e em seguida alocadas em estufa para secagem (MOLINARO; CAPUTO; AMENDOEIRA, 2010; SANTOS *et al.*, 2014).

4.6.1 Coloração com hematoxilina-eosina

Após secagem das lâminas com os cortes histológicos, as mesmas foram colocadas em um berço histológico de forma espaçada. A desparafinização é necessária para posterior hidratação, para tanto, as lâminas foram submetidas a dois banhos com xilol puro de 15 minutos cada. Em seguida, para hidratação, colocadas duas vezes em álcool absoluto por dois minutos cada, duas vezes em álcool 95% por dois minutos cada, duas vezes em álcool 70% por dois minutos cada e depois em água corrente também por dois minutos. Logo após, as lâminas foram mantidas por cinco minutos embebidas em Hematoxilina de Harris, após serem retiradas, foram colocadas sob água corrente por quinze minutos e em seguida submersas em Eosina por dez minutos. Posteriormente foi realizada a desidratação colocando-as por três vezes em álcool 95% por um minuto cada, três vezes em álcool absoluto por um minuto cada e três vezes em xilol por um minuto cada. Após estes procedimentos, as lâminas seguiram para montagem com lamínula (MOLINARO; CAPUTO; AMENDOEIRA, 2010).

4.6.2 Coloração com Tricômico de Masson

Para o preparo de 300ml da solução do tricômico de Masson foram dissolvidos 1,8g de Chromotrope 2R, 0,9g de azul de anilina e 1,8g de ácido fosfotungstico em 300ml de água destilada; estes ingredientes foram aquecidos e após esfriarem foram adicionados 3ml de ácido acético.

Da mesma forma que o preparo da coloração com hematoxilina-eosina, após secagem das lâminas com os cortes histológicos, foram colocadas em berço histológico com espaço entre as lâminas. Para desparafinização das lâminas, estas foram colocadas em uma primeira cuba com xilol puro por 15 minutos e posteriormente em outra cuba com xilol puro por mais 15 minutos. Em seguida, para hidratação, colocadas duas vezes em álcool absoluto por dois minutos cada, duas vezes em álcool 95% por dois minutos cada, duas vezes em álcool 70% por dois minutos cada e depois em água corrente também por dois minutos. Em seguida, a cesta é colocada em cuba com o tricômico de Masson por 15 minutos. Seguiu-se para desidratação colocando as lâminas por três vezes em álcool 95% por um minuto cada, três vezes em álcool absoluto por um minuto cada e três vezes em xilol por um minuto cada. Após estes procedimentos, as lâminas seguiram para montagem com lamínula (MOLINARO; CAPUTO; AMENDOEIRA, 2010).

4.6.3 Montagem das lâminas

Em uma capela foi realizada a montagem das lâminas; foram pingadas gotas de entellan sobre e ao redor do corte, colocadas as lamínulas e com a ajuda de uma pinça retiradas bolhas formadas. Em seguida, as lâminas foram mantidas em ar ambiente para secagem (MOLINARO; CAPUTO; AMENDOEIRA, 2010).

4.7 Análise microscópica

Após a confecção das lâminas, as mesmas foram avaliadas por um patologista experiente, através de uma análise cega, seguindo um escore pré-definido para: infiltrado inflamatório, atividade fibroblástica, atividade epitelial e angiogênese.

O universo amostral foi composto por quatro grupos distintos testados em um tempo experimental para variáveis independentes (infiltrado inflamatório, atividade fibroblástica, atividade epitelial, formação do colágeno e angiogênese). A avaliação por escore implica no uso de testes estatísticos não- paramétricos.

As análises histológicas dos cortes foram realizadas em microscópio Nikon Eclipse E200®. Para análise dos números de vasos sanguíneos foram identificadas as regiões das lesões e com a objetiva de 40 vezes foram capturadas imagens de vinte campos em cada amostra do tecido epitelial utilizando-se a câmera Premiere MA88-900® acoplada ao microscópio. As imagens foram transferidas para Notebook ASUS através do programa TSView7, a partir delas foram contabilizados o número de vasos em cada campo e posteriormente foi calculada a média. As demais análises histológicas foram realizadas por um patologista sem o conhecimento prévio da identificação dos grupos, com análise das lâminas nas objetivas de 4 vezes, 10 vezes e 40 vezes. Com as lâminas coradas com hematoxilina-eosina (HE) foi realizada análise da proliferação vascular, presença das células mononucleares, proliferação fibroblástica e epitelização das feridas. Nas lâminas coradas com o tricômico de Masson (TM) foi avaliada a deposição do colágeno das feridas.

Todos os dados obtidos foram classificados de acordo com a intensidade com que foram encontrados (ausente, discreto, moderado ou acentuado) e transformados em variáveis quantitativas mediante atribuição de escores de 0 a 3 de acordo com a intensidade do achado histológico, conforme demonstrado no Quadro 1 (GARROS *et al.*, 2006; BEHEREGARAY *et al.*, 2014).

Quadro 1- Classificação e atribuição de índices aos achados histológicos de HE (Hematoxilina – Eosina) e TM (Tricrômico de Masson)

Achado HE/TM	Intensidade dos achados			
	Ausente Escore= 0	Discreto Escore=1	Moderado Escore= 2	Acentuado Escore= 3
Proliferação vascular	Ausência de vasos no corte histológico.	Quando visibilizados poucos vasos e situados de forma isolada no contexto	Quando apareciam vasos com maior frequência e dispersos no campo óptico	Quando evidenciado os vasos com grande frequência, dispostos em todo o contexto.
	Escore= 0	Escore=1	Escore= 2	Escore= 3
Células Mononucleares	Quando estas células não eram visualizadas no campo óptico.	Evidenciadas de forma isolada, possibilitando distinguir áreas livres de infiltrado.	Presença com maior frequência, constituindo agregados densos, mas que possibilita visualização de áreas livres de infiltrado.	Quando as células foram evidenciadas com grande frequência, constituindo agregados densos e justapostos, sem áreas livres de infiltrados.
	Escore= 0	Escore=1	Escore= 2	Escore= 3
Proliferação Fibroblástica	Quando não se evidenciava proliferação de fibroblastos.	Quando havia esparsos fibroblastos proliferados em meio a tecido conjuntivo frouxo	Quando havia moderada quantidade de fibroblastos proliferados, constituindo pequenos feixes celulares multidirecionalmente.	Quando havia grande quantidade de fibroblastos proliferados constituindo agregados compactos de células arranjadas multidirecionalmente.
	Escore= 0	Escore=1	Escore= 2	Escore= 3
Colagenização	Quando não havia fibras colágenas depositadas	Quando a deposição de fibras colágenas era em pequena quantidade, caracterizadas por fibras depositadas em meio aos fibroblastos proliferados.	Quando a deposição de colágeno formava feixes de fibras eosinofílicas, espessas, intercaladas com áreas de tecido conjuntivo frouxo e fibroblastos proliferados.	Quando havia grande deposição de fibras colágenas, constituindo feixes de fibras eosinofílicas espessas, compactamente arranjadas em meio a fibroblastos proliferados e sem áreas de tecido conjuntivo frouxo.
	Escore= 1	Escore= 2	Escore= 3	
Re-epitelização	Ausência de epitélio visibilizado no campo óptico.	Presença de novo tecido de epiteliação de forma incompleta ou parcial.		Presença de novo tecido de epiteliação de forma total ou completa sobre o tecido conjuntivo.

Legenda: HE= Hematoxilina – Eosina; TM= Tricrômico de Masson.

4.8 Análise estatística

Os resultados foram submetidos a análise utilizando-se o software estatístico GraphPad Prisma versão 5.0. As comparações entre os grupos na avaliação do tamanho das feridas no decorrer do experimento, foram realizadas utilizando-se two-way ANOVA, seguido do pós teste de Bonferroni; nível de significância menor que 0,05. Para a análise da angiogênese foi utilizado teste Mann-Whitney (teste t para dados não paramétricos); nível de significância menor que 0,05. Nas demais análises as comparações entre os grupos foram realizadas utilizando-se one-way ANOVA teste Kruskal-Wallis, seguido do pós teste de Dunn. Os testes foram realizados com um nível de significância menor que 0,05.

5 RESULTADOS

Os pesos dos animais foram mensurados uma vez por semana no decorrer da pesquisa. É demonstrado na Tabela 1, cinco mensurações, sendo que as da primeira semana foram realizadas no dia anterior da indução das feridas e as da quinta semana, realizadas no penúltimo dia do experimento. É possível notar que da primeira para segunda semana houve redução do peso em seis animais; da segunda para terceira semana um animal manteve com o mesmo peso e os demais tiveram aumento. Da terceira para quarta semana e da quarta para quinta semana todos os animais apresentaram aumento do peso. De forma estatística os pesos dos animais na quinta semana são diferentes, maiores, quando comparados com a segunda semana.

Tabela 1: Peso dos animais no decorrer do experimento

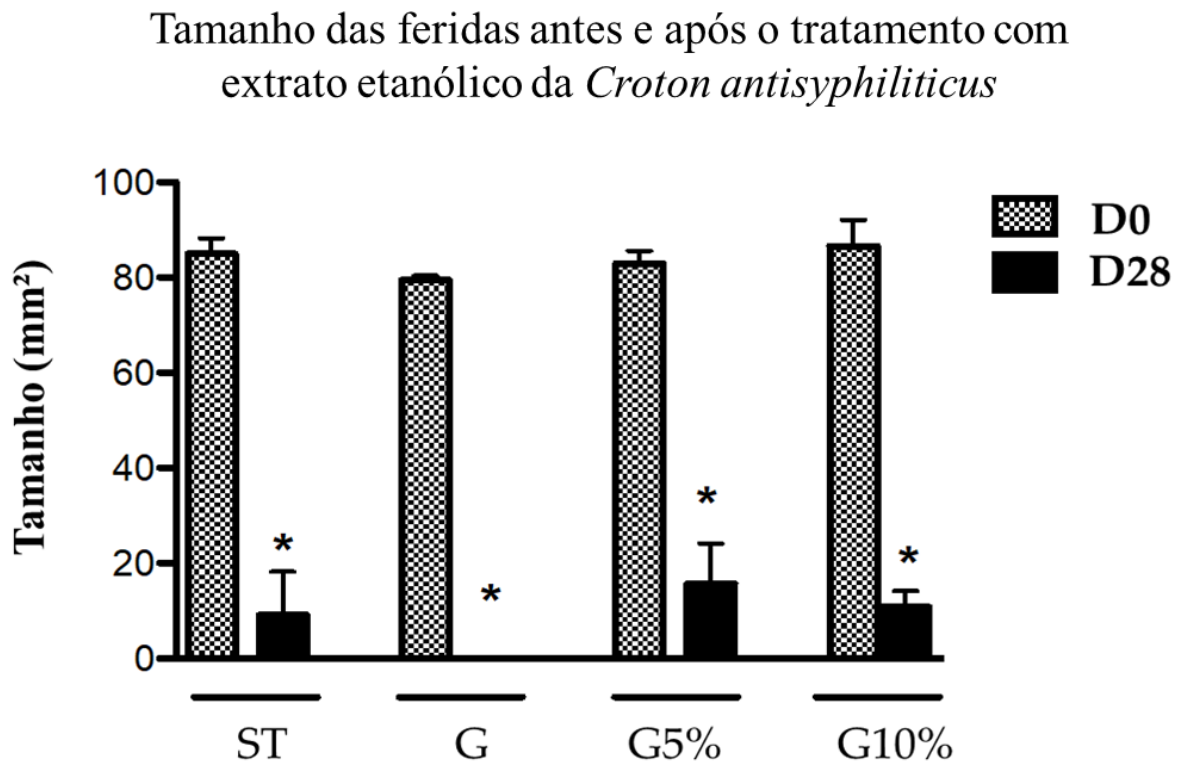
Peso dos animais (g)					
Identificação dos animais	Primeira semana	Segunda semana	Terceira semana	Quarta semana	Quinta semana
1	335	330	340	355	370
2	320	310	310	330	335
3	295	265	285	310	335
4	345	350	355	370	375
5	305	285	295	310	325
6	300	270	290	315	330
7	310	270	295	315	335
Média	315,7	297,1	310,0	329,3	343,6*
DP	18,58	33,40	27,08	24,05	20,15

Legenda: Primeira semana= última pesagem ante da indução das feridas. Quinta semana= última pesagem antes do término do experimento. * = Os pesos dos animais na segunda semana são diferentes dos pesos dos animais na quinta semana. Resultados obtidos com a utilização do software estatístico GraphPad Prisma versão 5.0; com as comparações entre os grupos realizadas utilizando-se teste Kruskal-Wallis, seguido do pós teste de Dunn; nível de significância menor que 0,05.

5.1 Avaliação macroscópica

Na avaliação macroscópica foi possível notar a diminuição gradativa das feridas com a evolução do tempo, como representado no Gráfico 1. Como pode ser observado, as áreas das feridas regrediram de maneira expressiva em todos os grupos.

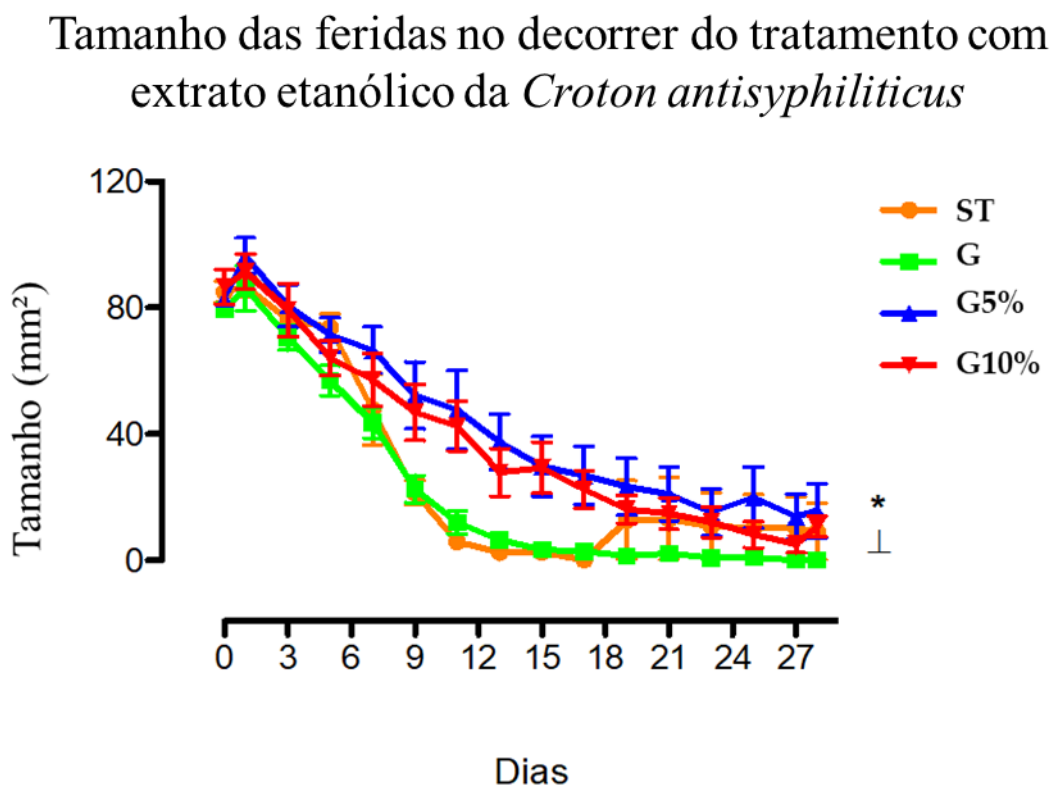
Gráfico 1. Tamanho da ferida em mm² no início e no final do estudo.



Legenda: D0= Dia da indução das feridas. D28= Último dia de avaliação das feridas, dia da eutanásia e coleta das amostras dos tecidos. ST= Grupo de feridas sem tratamento, G= grupo de feridas tratadas apenas com o veículo (gel), G5%= grupo de feridas tratadas com extrato da *Croton antisiphiliticus* a 5%, G10%= grupo de feridas tratadas com extrato da *Croton antisiphiliticus* a 10%. * = Grupos nos quais houve diferença no tamanho das feridas no início e ao final do estudo, $p < 0,05$. Resultados obtidos com a utilização do software estatístico GraphPad Prisma versão 5.0; com as comparações entre os grupos realizadas utilizando-se one-way ANOVA teste Kruskal-Wallis, seguido do pós teste de Dunn; nível de significância menor que 0,05.

No 11º dia de tratamento houve fechamento total da lesão ST em um dos animais da amostra e no 13º dia de tratamento ocorreu o fechamento completo da ferida G de outro animal. Houve diferença entre o grupo G5% e o grupo ST nos dias 09, 10 e 13 de tratamento e entre o grupo G10% e o ST no 11º dia do tratamento (Gráfico 2).

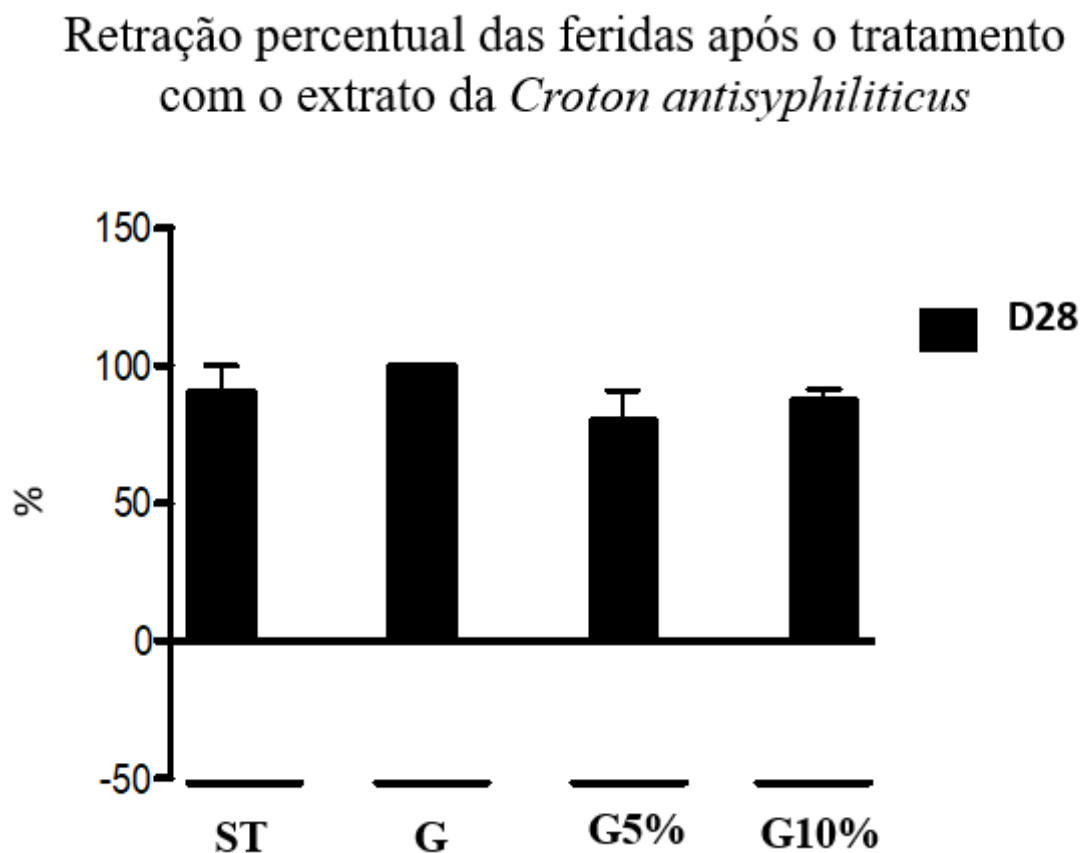
Gráfico 2. Regressão do tamanho das feridas no decorrer dos tratamentos.



Legenda: ST= Grupo de feridas sem tratamento, G= grupo de feridas tratadas apenas com o veículo (gel), G5%= grupo de feridas tratadas com extrato da *Croton antisiphiliticus* a 5%, G10%= grupo de feridas tratadas com extrato da *Croton antisiphiliticus* a 10%. Dias= número de dias do experimento. * = G10% diferente de ST no 11º dia do experimento, $p < 0,05$. ⊥ = G5% diferente de ST no 9º, 10º e 13º dias do experimento, $p < 0,05$. Resultados obtidos com a utilização do software estatístico GraphPad Prisma versão 5.0; com as comparações entre os grupos realizadas utilizando-se two-way ANOVA, seguido do pós teste de Bonferroni; nível de significância menor que 0,05.

No decorrer do estudo ocorreu o aumento da retração percentual das feridas, como observado no Gráfico 3.

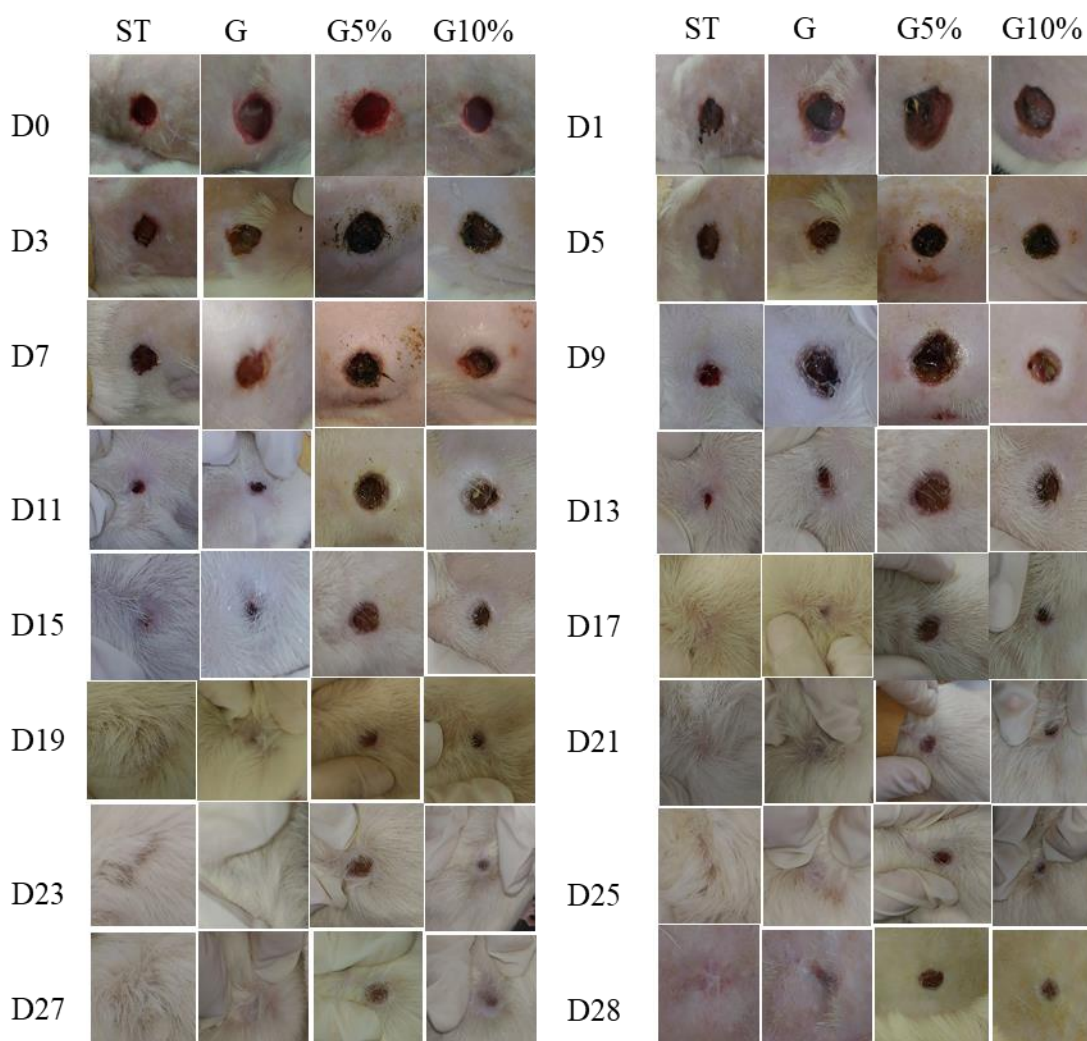
Gráfico 3. Retração percentual das feridas após os tratamentos.



Legenda: D0= Dia da indução das feridas. D28= Último dia de avaliação das feridas, dia da eutanásia e coleta das amostras dos tecidos. ST= Grupo de feridas sem tratamento, G= grupo de feridas tratadas apenas com o veículo (gel), G5%= grupo de feridas tratadas com extrato da *Croton antisiphiliticus* a 5%, G10%= grupo de feridas tratadas com extrato da *Croton antisiphiliticus* a 10%. %= Percentual de retração das feridas.

Ao final do experimento o grupo G apresentou regressão completa da lesão em todos os animais, o grupo ST teve um animal sem completa regressão da lesão. Quatro animais do grupo G5% e seis animais do G10% não alcançaram o fechamento completo da ferida ao final dos 28 dias de tratamento. Podemos observar na Figura 8 a evolução das feridas de cada grupo, nesta figura podemos notar também o crescimento dos pelos ao redor das lesões, que foi aumentando com o decorrer do experimento.

Figura 8. Evolução dos grupos de feridas por dia de avaliação.



Legenda: As linhas representam os dias de avaliação e medição das feridas, as colunas os grupos de feridas. ST= Grupo de feridas sem tratamento, G= grupo de feridas tratadas apenas com o veículo (gel), G5%= grupo de feridas tratadas com extrato da *Croton antisiphiliticus* a 5%, G10%= grupo de feridas tratadas com extrato da *Croton antisiphiliticus* a 10%.

5.2 Análise microscópica

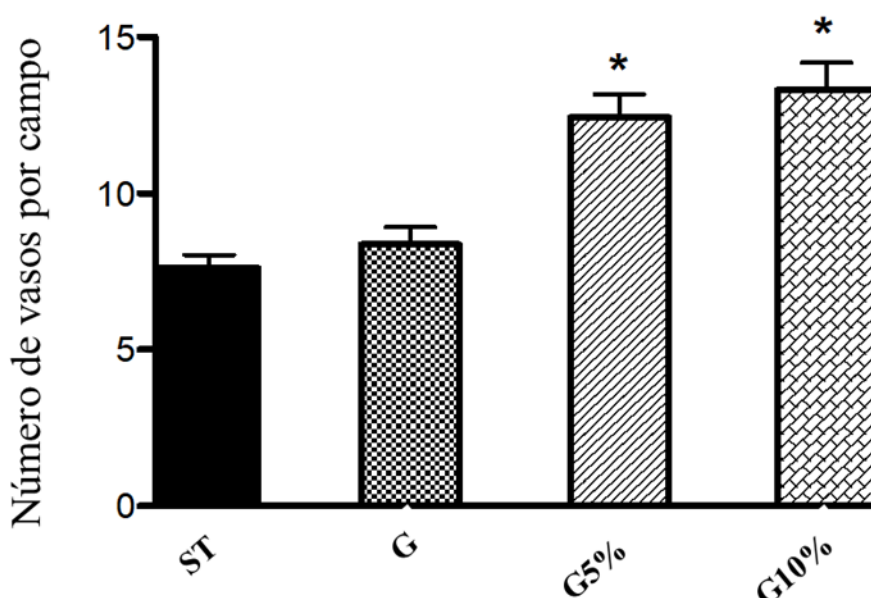
Os grupos experimentais foram definidos como ST (sem tratamento), G (tratado com gel), G5% (tratado com extrato a 5%) e G10% (tratado com extrato a 10%) e tiveram amostras dos tecidos coletadas ao final do 28º dia de acompanhamento e analisadas microscopicamente para avaliação da proliferação vascular, das células mononucleares, proliferação fibroblásticas, formação do tecido epitelial e a colagenização.

5.2.1 Proliferação vascular

De acordo com a avaliação da proliferação vascular é observada presença de maior quantidade de novos vasos sanguíneos nos grupos G5% e G10%. Não houve diferença entre os grupos G5% e G10%. Os grupos G5% e G10% diferem de ST (Gráfico 4).

Gráfico 4. Avaliação da proliferação vascular.

Contagem de vasos na área de reparo das feridas tratadas com extrato etanólico da *Croton antisiphiliticus*



Legenda: ST= Grupo de feridas sem tratamento, G= grupo de feridas tratadas apenas com o veículo (gel), G5%= grupo de feridas tratadas com extrato da *Croton antisiphiliticus* a 5%, G10%= grupo de feridas tratadas com extrato da *Croton antisiphiliticus* a 10%. Número de vasos por campo= número médio de vasos por campo avaliado. *= G5% e G10% diferentes de ST, $p < 0,05$. Resultados obtidos com a utilização do software estatístico GraphPad Prisma versão 5.0; utilizado teste Mann-Whitney (teste t para dados não paramétricos); nível de significância menor que 0,05.

Na análise dos vasos sanguíneos formados nos tecidos cicatriciais das feridas tratadas ou não com o extrato etanólico da *Croton antisiphiliticus*, os animais apresentaram proliferação vascular discreta, moderada ou acentuada. Os grupos de feridas ST e G tiveram o mesmo padrão de proliferação assim como os grupos G5% e G10%. Cinco feridas do grupo ST, assim como cinco no grupo G, foram consideradas com proliferação vascular discreta. Duas feridas do grupo ST, uma no grupo G, duas no grupo G5% e duas no grupo G10% foram consideradas

moderadas. Classificadas como proliferação vascular acentuada foi uma ferida do grupo G, cinco do grupo G5% e cinco do grupo G10% (Tabela 2). Houve diferença entre o grupo ST e os grupos G5% e G10% ($p < 0,05$).

Tabela 2 – Intensidade da proliferação vascular observada no processo de reparação tecidual.

	ST	G	G5%	G10%
Ausente	0	0	0	0
Discreta	5	5	0	0
Moderada	2	1	2	2
Acentuada	0	1	5	5
Total	7	7	7	7

p= 0,0001

Legenda: ST= Grupo de feridas sem tratamento, G= grupo de feridas tratadas apenas com o veículo (gel), G5%= grupo de feridas tratadas com extrato da *Croton antisiphiliticus* a 5%, G10%= grupo de feridas tratadas com extrato da *Croton antisiphiliticus* a 10%. Total= quantidade total de animais da pesquisa. Resultados obtidos com a utilização do software estatístico GraphPad Prisma versão 5.0; com as comparações entre os grupos realizadas utilizando-se one-way ANOVA teste Kruskal-Wallis, seguido do pós teste de Dunn; nível de significância menor que 0,05.

Pode-se observar nas imagens A, B e C da Figura 9 a presença discreta de novos vasos sanguíneos formados no tecido cicatricial de um animal do grupo ST. Nas imagens D e E observa-se presença acentuada de vasos sanguíneos neoformados no tecido cicatricial de um animal do grupo G5%. A acentuada presença de vasos sanguíneos observada na análise histológica do grupo G5% é equivalente ao G10%.

Figura 9. Avaliação histológica do processo de cicatrização de feridas induzidas na pele de ratos e tratadas com extrato etanólico da *Croton antisiphiliticus*

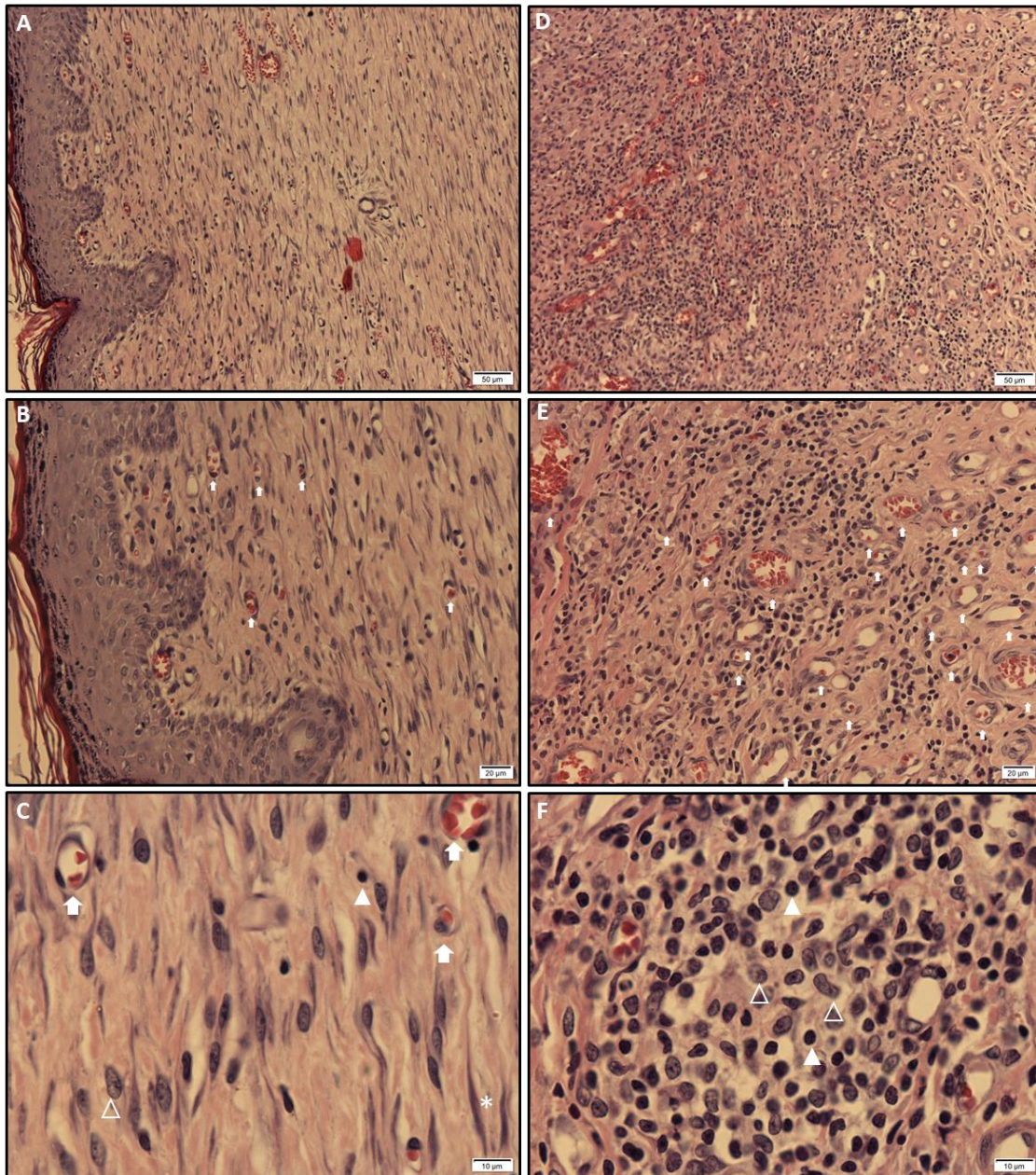


Imagem A-F: Cortes histológicos de feridas induzidas na pele de ratos tratados, ou não, por 28 dias com extrato de *Croton antisiphiliticus*. A, B e C – Grupo sem tratamento. (A) – Visão geral da região da ferida após 28 dias. Observar epitélio regenerado; Barra = 50 µm. (B) – Notar a presença de alguns vasos sanguíneos (setas); Barra = 20 µm. (C) – Observar a presença de raras células inflamatórias mononucleares; linfócito (cabeça de seta preenchida) e macrófago (cabeça de seta vazada); pode-se observar ainda a presença de alguns fibroblastos (asterisco), além de alguns vasos sanguíneos (setas); Barra = 10 µm. D, E e F – Grupo tratado com 5% de extrato de *Croton antisiphiliticus*. (D) – Visão geral da região da ferida após 28 dias de tratamento; Barra = 50 µm. (E) – Observar a presença de grande número de vasos sanguíneos neoformados (setas); Barra = 20 µm. (F) – Notar intenso infiltrado inflamatório de mononucleares. Observar a presença de macrófagos (cabeças de setas vazadas) e linfócitos (cabeças de setas preenchidas); Barra = 10 µm. A-F: H&E.

5.2.2 Células mononucleares

Em relação a intensidade de células mononucleares, as sete feridas do grupo ST foram classificadas como discreta. No grupo de feridas G, duas feridas foram classificadas como discretas e cinco como moderadas. Em G5%, foram avaliados com intensidade moderada e acentuada, com três e quatro feridas respectivamente em cada. Quatro feridas com intensidade acentuada, duas com intensidade moderada e uma com intensidade discreta, foram encontradas no grupo G10% (Tabela 3).

Tabela 3 – Intensidade de mononucleares observados no processo de reparação tecidual

	ST	G	G5%	G10%
Ausente	0	0	0	0
Discreta	7	2	0	1
Moderada	0	5	3	2
Acentuada	0	0	4	4
Total	7	7	7	7

p= 0,0008

Legenda: ST= Grupo de feridas sem tratamento, G= grupo de feridas tratadas apenas com o veículo (gel), G5%= grupo de feridas tratadas com extrato da *Croton antisiphiliticus* a 5%, G10%= grupo de feridas tratadas com extrato da *Croton antisiphiliticus* a 10%. Total= quantidade total de animais da pesquisa. Resultados obtidos com a utilização do software estatístico GraphPad Prisma versão 5.0; com as comparações entre os grupos realizadas utilizando-se one-way ANOVA teste Kruskal-Wallis, seguido do pós teste de Dunn; nível de significância menor que 0,05.

Na análise dos dados foi identificada diferença entre os grupos ST e o grupo G5%, assim como entre o grupo ST e grupo G10%, com $p < 0,05$.

Na imagem C da Figura 9, pode-se observar presença discreta de células inflamatórias mononucleares, como linfócitos e macrófagos, em um animal do grupo ST. Já na imagem F observa-se infiltrado acentuado de células mononucleares, em um animal do grupo G5%.

5.2.3 Proliferação fibroblástica

Na avaliação da presença de fibroblastos, duas feridas do grupo G e uma ferida do grupo G5% foram classificadas como discreta. Todas as sete feridas do grupo ST, cinco feridas do grupo G, seis feridas do grupo G5% e cinco feridas do grupo G10% foram classificadas como

moderada. Intensidade acentuada de fibroblastos foi verificada presente em dois animais do grupo G10% (Tabela 4).

Tabela 4 – Intensidade da proliferação fibroblástica observada no processo de reparação tecidual

	ST	G	G5%	G10%
Ausente	0	0	0	0
Discreta	0	2	1	0
Moderada	7	5	6	5
Acentuada	0	0	0	2
Total	7	7	7	7

p= 0,0805

Legenda: ST= Grupo de feridas sem tratamento, G= grupo de feridas tratadas apenas com o veículo (gel), G5%= grupo de feridas tratadas com extrato da *Croton antisiphiliticus* a 5%, G10%= grupo de feridas tratadas com extrato da *Croton antisiphiliticus* a 10%. Total= quantidade total de animais da pesquisa. Resultados obtidos com a utilização do software estatístico GraphPad Prisma versão 5.0; com as comparações entre os grupos realizadas utilizando-se one-way ANOVA teste Kruskal-Wallis, seguido do pós teste de Dunn; nível de significância menor que 0,05.

Ao ser realizada a análise estatística dos dados foi observado que não houve diferença entre os grupos de feridas, o nível de significância apresentou-se maior que 0,05 nas correlações.

É possível observar a presença de fibroblastos na Figura 9, imagem C, que representa o tecido cicatricial do grupo de feridas ST, classificadas como intensidade moderada.

5.2.4 Re-epitelização

No processo de re-epitelização do tecido epitelial das feridas tratadas ou não com extrato etanólico da *Croton antisiphiliticus* foi identificado que uma ferida do grupo ST, duas feridas do grupo G5% e três feridas do grupo G10% não apresentaram tal processo, sendo classificadas como ausente. Considerados como re-epitelização discreta ou moderada, aquelas que o apresentaram de forma parcial, uma ferida do grupo ST, três feridas do grupo G, duas feridas do grupo G5% e uma ferida do grupo G10%. Classificados como acentuado temos o processo de epitelização completo, que foi encontrado em cinco feridas do grupo ST, quatro feridas do

grupo G, três feridas do grupo G5% e três feridas do grupo G10%. Apenas o grupo de feridas G apresentou em todos os animais epitelização parcial ou total do tecido cicatricial (Tabela 5).

Tabela 5 – Intensidade da re-epitelização observada no processo de reparação tecidual

	ST	G	G5%	G10%
Ausente	1	0	2	3
Discreta/Moderada	1	3	2	1
Acentuada	5	4	3	3
Total	7	7	7	7

p= 0,5095

Legenda: ST= Grupo de feridas sem tratamento, G= grupo de feridas tratadas apenas com o veículo (gel), G5%= grupo de feridas tratadas com extrato da *Croton antisiphiliticus* a 5%, G10%= grupo de feridas tratadas com extrato da *Croton antisiphiliticus* a 10%. Total= quantidade total de animais da pesquisa. Resultados obtidos com a utilização do software estatístico GraphPad Prisma versão 5.0; com as comparações entre os grupos realizadas utilizando-se one-way ANOVA teste Kruskal-Wallis, seguido do pós teste de Dunn; nível de significância menor que 0,05.

Na avaliação estatísticas deste processo, os grupos de feridas não apresentaram diferença, o nível de significância encontrado foi maior que 0,05.

É observado na Figura 10, imagem C, a representatividade da re-epitelização das feridas ST, das quais cinco apresentaram fechamento completo. Nas imagens E e F da Figura 10, estão presentes partes do tecido de re-epitelização das feridas tratadas com extrato etanólico da *Croton antisiphiliticus* a 10%. O grupo G5% apresenta o mesmo padrão apresentado no grupo G10%.

5.2.5 Colagenização

Na avaliação da deposição de colágeno, os grupos foram classificados como discreta, moderada ou acentuada. Duas feridas do grupo ST, três feridas do grupo G, quatro feridas do grupo G5% e todas as feridas do grupo G10% foram classificadas como colagenização discreta. Três feridas do grupo ST, duas feridas do grupo G e duas feridas do grupo G5% foram classificadas como moderada. Duas feridas do grupo ST, duas feridas do grupo G e uma ferida do grupo G5% tiveram a intensidade classificada como acentuada (Tabela 6).

Tabela 6 – Intensidade da colagenização observada no processo de reparação tecidual

	ST	G	G5%	G10%
Ausente	0	0	0	0
Discreta	2	3	4	7
Moderada	3	2	2	0
Acentuada	2	2	1	0
Total	7	7	7	7

p= 0,0603

Legenda: ST= Grupo de feridas sem tratamento, G= grupo de feridas tratadas apenas com o veículo (gel), G5%= grupo de feridas tratadas com extrato da *Croton antispyhiliticus* a 5%, G10%= grupo de feridas tratadas com extrato da *Croton antispyhiliticus* a 10%. Total= quantidade total de animais da pesquisa. Resultados obtidos com a utilização do software estatístico GraphPad Prisma versão 5.0; com as comparações entre os grupos realizadas utilizando-se one-way ANOVA teste Kruskal-Wallis, seguido do pós teste de Dunn; nível de significância menor que 0,05.

Os dados obtidos com esta análise, no entanto, não apresentaram diferenças entre os grupos, o nível de significância encontrado foi maior que 0,05.

Na Figura 10 pode-se observar a formação do colágeno, nas imagens A e B é visto tecido íntegro, sem processo cicatricial, com presença de tecido conjuntivo denso e fibras colágenas espessas na derme profunda. Nas amostras de tecido do grupo ST, observadas nas imagens C e D temos a derme apresentando tecido conjuntivo denso, mas menos espesso em comparação às da pele normal; o grupo de feridas G, que foram tratada apenas com o veículo, apresentaram o mesmo padrão de ST. Nas imagens E e F são representados as feridas do grupo G10%, que apresentaram o mesmo padrão do grupo G5%; a derme nestas amostras são constituídas por tecido conjuntivo frouxo com fibras colágenas mais delgadas.

Figura 10. Avaliação histológica da colagenização observada no processo de cicatrização de feridas induzidas na pele de ratos e tratadas com extrato etanólico da *Croton antispyhiliticus*.

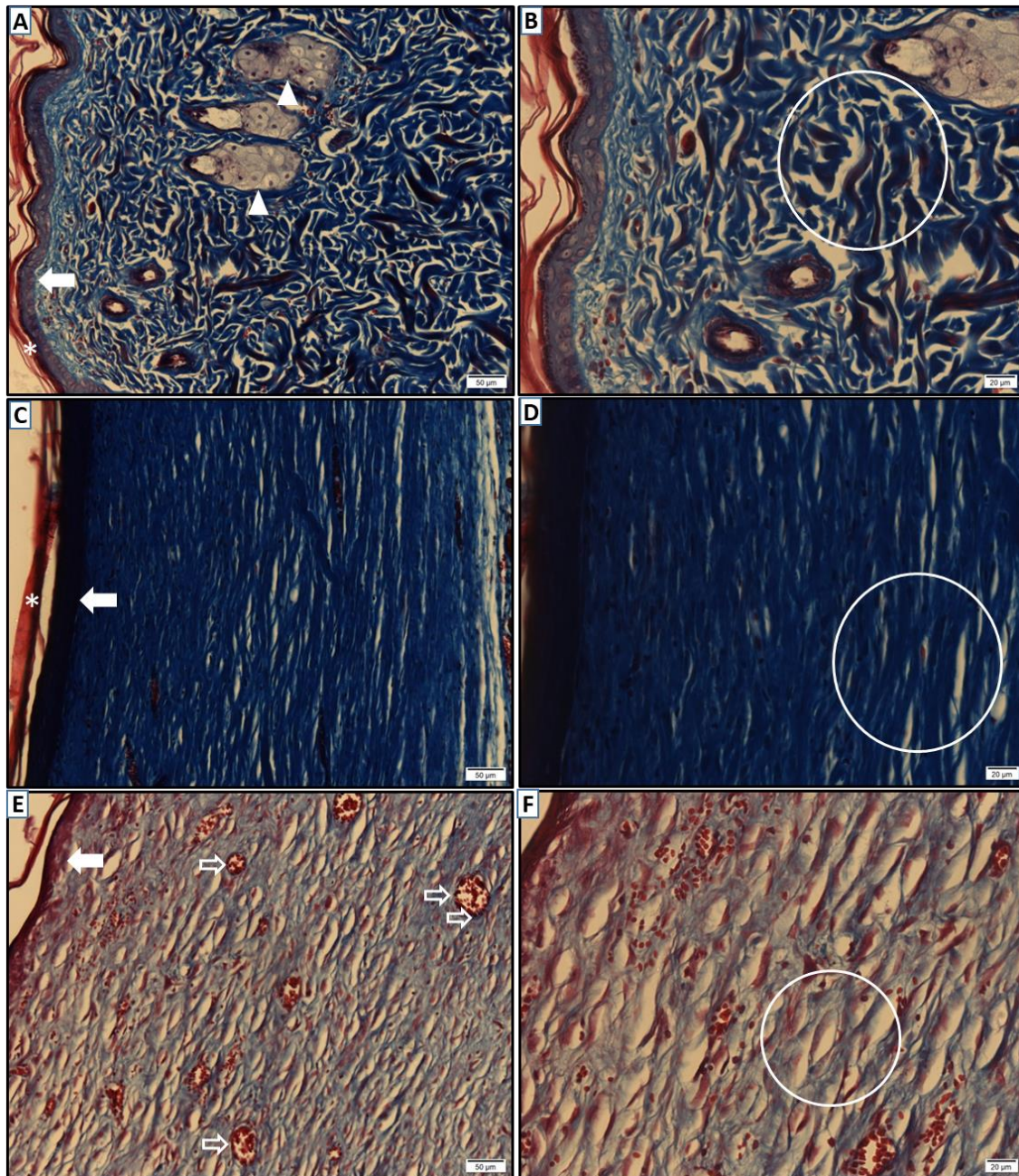


Figura A-F: Cortes histológicos de pele normal e de feridas induzidas na pele de ratos tratados, ou não, por 28 dias com extrato de *Croton antispyhiliticus*. (A – B) – Grupo pele normal. – (A) - Visão geral da região da pele. Observar à esquerda a epiderme (seta) apresentando queratina (asterisco) e derme apresentando glândulas (cabeça de seta) e tecido conjuntivo denso; Barras = 50 μm. (B) – Notar a presença de fibras colágenas espessas na derme profunda (círculo); Barra = 20 μm. (C-D) – Grupo sem tratamento. (C) – Visão geral da área da ferida. Observar à esquerda a epiderme (seta) apresentando queratina (asterisco) e derme apresentando tecido conjuntivo denso; Barra = 50 μm. (D) – Observar fibras colágenas espessas, porém menos espessas em comparação às da pele normal (círculo); Barra = 20 μm. (E-F) – Grupo tratado com extrato de *Croton antispyhiliticus* a 10%. (E) – Visão geral da área da ferida. Observar na parte superior à esquerda a epiderme (seta), notar ainda grande número de vasos sanguíneos na derme (setas vazadas), sendo esta constituída por tecido conjuntivo frouxo. Barra = 50 μm. (F) – Observar fibras colágenas menos coradas e mais delgadas (círculo); Barra = 20 μm. A-F: Tricrômico de Masson.

6 DISCUSSÃO

A disponibilidade dos recursos tecnológicos é distribuída de forma discrepante entre a população, há regiões que não tem acesso aos tratamentos adequados para feridas, recorrem então muitas vezes aos produtos naturais, como as plantas medicinais, as quais em grande parte não possuem comprovação científica de suas ações. Ainda há grande necessidade de estudos sobre as plantas medicinais, para que sejam ampliadas as opções de tratamentos adequados e de baixo custo para as pessoas, além de evitar o uso inadequado de coberturas que podem prejudicar a cura de feridas. (LIMA; GUERRA, 2011; MAJEWSKA; GENDASZEWSKA-DARMACH, 2011).

No presente estudo, foi avaliada a possível atividade cicatrizante da *Croton antisiphiliticus* em feridas excisionais induzidas em *Rattus norvegicus* albinus por uso do extrato etanólico preparado das folhas nas concentrações de 5% e 10%. Foram apresentados resultados sobre o tempo de retração das feridas, além da análise das amostras dos tecidos quanto a formação de novos vasos sanguíneos, infiltrado inflamatório, atividade fibroblástica, formação do colágeno e do epitélio. Essas variáveis são passíveis de mudanças durante o tratamento de uma lesão, fazendo parte do processo cicatricial.

Foram mensurados os pesos dos animais uma vez por semana no decorrer do estudo experimental, com isso foi possível observar redução do peso em seis animais uma semana após a indução das feridas e posteriormente um animal manteve o peso da segunda para terceira semana e os demais obtiveram aumento, no decorrer das outras semanas todos tiveram aumento. A diferença foi significativa entre a segunda e a terceira semana, sendo nesta os maiores pesos. A perda de peso associado ao processo inflamatório, parte importante da cicatrização, está relacionada à presença do Fator de Necrose Tumoral (TNF) produzido por este processo. O nível sérico aumentado do TNF estimula a produção de leptina, uma proteína que quando elevada relaciona-se à sensação de saciedade, estimula o gasto energético e a redução do consumo de alimentos (SARMENTO *et al.*, 2014).

Para que uma planta apresente potencial farmacológico para cicatrização, ela deve interferir positivamente em no mínimo duas fases deste processo (BALEKARA *et al.*, 2012). Foi notado ao término do período experimental que todas as feridas apresentaram regressão do seu tamanho, as feridas tratadas com o extrato estudado tiveram um maior tempo de recuperação do tecido. Na avaliação microscópica, apenas as variáveis angiogênese e a proliferação de células mononucleares apresentaram diferenças entre os grupos, sendo o número de vasos por campo nos grupos G5% e G10% maior quantidade que em ST; em relação

à análise da intensidade de presença dos vasos sanguíneos, G5% e G10% apresentavam maior intensidade que em ST; na avaliação das células mononucleares, em G5% e G10% foram detectadas maior quantidade que em ST.

Em estudo sobre o potencial cicatricial da *Passiflora edulis* também foi observada diminuição gradativa das áreas das feridas com a evolução do tempo, porém quando o grupo controle e de estudo foram comparados não apresentaram diferenças. O uso tópico do extrato de *Passiflora edulis* não apresentou efeito na cicatrização da pele de ratos em relação à área cirúrgica (GARROS, *et al.*, 2006). Pesquisa sobre potencial de cicatrização com a *Memora nodosa*, planta na qual já foram detectadas a presença de saponinas e flavonóides nas raízes e saponinas, flavonóides e óleo essencial nas folhas, componentes estes já evidenciados como portadores de propriedades cicatrizantes, observaram em relação ao tamanho das feridas, o decréscimo da área lesada ao longo do tempo de tratamento, mas não houve diferença na contração relativas das feridas entre os grupos tratados e o grupo controle. Constataram que a solução aquosa a 2% do extrato bruto das folhas da *Memora nodosa* não apresentou atividade cicatrizante (TRESVENZOL *et al.*, 2013). A *Raffesia Hasseltii* foi avaliada por Abdulla *et al.* (2009) quanto ao seu potencial cicatricial, foi revelado que as feridas tratadas com extratos desta planta, como aplicação tópica em feridas, acelera o processo de cicatrização, porém, não foram encontradas diferenças entre feridas tratadas com 5%, 10% de seu extrato ou gel no que diz respeito à taxa de aceleração do processo de cicatrização da ferida (ABDULLA *et al.*, 2009). Assim como a *Croton antisiphiliticus* utilizada no presente trabalho, essas são plantas consideradas pela população para tratamento de feridas apenas pelo costume popular, mas que apresentaram controvérsias quando realizados estudos científicos (GARROS *et al.*, 2006).

Na literatura é possível encontrar vários estudos com plantas cujas atividades cicatrizantes de uso popular foram confirmadas por meio de pesquisas científicas. Pesquisa com a *Hibiscus rosa* concluiu que o extrato de sua flor pode ser usado de forma eficiente como agente cicatrizante de feridas (BHASKAR; NITHYA, 2012). Yadav *et al.* (2014) avaliaram a *Argyreia speciosa* e detectaram diminuição da ferida com seu uso, o que sugere forte potencial de cicatrização desta planta. Fikru *et al.* (2012) detectaram em seu estudo que ratos tratados com extrato metanólico de *Achyranthes aspera* L. a 5% e 10%, mostraram cura mais rápida das feridas. Pomada administrada topicamente preparada a partir da fração n-butanol de flores de *Bellis perennis* foi avaliada e confirmada para atividade cicatricial em ferida por excisão circular em ratos (KARAKAS *et al.*, 2012). Maurya; Semwal; Dubey (2016), comprovaram em seu estudo que o processo de cicatrização de feridas no modelo de ratos diabéticos pode ser melhorado pelo uso do extrato de folhas hidroalcoólicas de *Chrozophora tinctoria* administrado

através de via oral e tópica. Estudo de Mekonnen *et al.* (2013) forneceu evidências de que as folhas de *Kalanchoe petitiiana* A. Rich possuem atividades notáveis de cicatrização de feridas, o que sustenta o uso popular da planta. Os resultados do estudo de Nayak *et al.* (2014) mostraram que o extrato de *Neurolaena lobata* L. tem potencial para uso no tratamento de feridas devido presença de componentes capazes de sessar o sangramento de feridas recém formadas, de inibir crescimento de bactérias e estimular da proliferação tecidual.

Al-Bayatya *et al.* (2012), detectaram que feridas de ratos tratadas com extrato aquoso de *Andrographis paniculata* a 10% possui taxa de cicatrização significativa quando comparado com o placebo, além de mostrarem em nível histológico presença de grandes quantidades de proliferação de fibroblastos, maior intensidade de fibras de colágeno e de angiogênese, e menor quantidade de células inflamatórias em comparação com feridas tratadas com água deionizada estéril ou placebo. As feridas cobertas com gel ou com extrato a 10% de *Andrographis paniculata* apresentaram o tempo de cicatrização menor do que as cobertas com o extrato a 5% de *Andrographis paniculata*. Não houve diferenças entre as feridas tratadas com extrato de *Andrographis paniculata* a 10% e gel em termos de duração (AL-BAYATYA *et al.*, 2012).

Foi possível notar que ao final da presente pesquisa houve crescimento completo dos pelos ao redor de todas as feridas nos animais, o que estabelece uma conexão com a regressão das lesões, visto que o processo cicatricial estimula também o desenvolvimento de folículos pilosos e consequente crescimento de pelos (BEHEREGARAY *et al.*, 2014).

A angiogênese nos tecidos de granulação melhora a circulação no local da ferida e proporciona assim oxigênio e nutrientes essenciais para o processo de cicatrização; desta forma, otimiza o processo cicatricial em feridas agudas e crônicas (BUNTROCK; JENTZSCH; HEDER, 1982; SZABO *et al.*, 1995; BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; AKHAVANI *et al.*, 2008; BAO *et al.*, 2009).

Na análise da formação dos novos vasos sanguíneos neste trabalho, o maior número de feridas foi classificado como discreto nos grupos ST e G e como intenso em G5% e G10%, o que justifica o aumento no tempo de cicatrização nestes grupos testes, visto que a presença da angiogênese em maior intensidade é detectada na fase proliferativa do processo de cicatrização, o que nos faz perceber que estas lesões com atraso no fechamento permaneceram estagnadas nesta fase do processo cicatricial (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).

Em comparação com outros estudos sobre atividade cicatricial de plantas em relação a proliferação vascular, a avaliação histológica da *Passiflora edulis* em estudo de Garros *et al.* (2006) não detectaram diferenças entre os grupos teste e controle estudados.

Em relação à presença de células mononucleares, no 7º dia de pós-operatório, elas foram classificadas como moderadas em oito animais e acentuadas em dois animais do grupo controle; discretas em oito animais e moderadas em dois animais do grupo *Passiflora*. Houve diferença entre os grupos no 7º e no 14º dia de pós-operatório, já no 21º dia de pós-operatório, não houve diferença entre os grupos (GARROS *et al.*, 2006). Na presente pesquisa com a *Croton antisiphiliticus*, temos diferença entre os grupos de feridas sem tratamento (ST) e o grupo de feridas G5% e o G10%. Foram classificados em sua maioria como intensa as feridas G5% e G10% e discretas as ST, o que nos leva a crer que como ST obteve um fechamento mais rápido e eficaz que as lesões tratadas com os extratos etanólicos da *Croton antisiphiliticus* a 5% e 10% estas feridas ainda sem encontravam no processo de fagocitose dos microrganismos e desbridamento tecidual permanecendo na fase inflamatória do processo cicatricial.

Em seu estudo, Fikru *et al.* (2012), estimam que a maior proliferação celular e infiltração, detectadas em amostras de tecidos animais submetidos à avaliação quanto a capacidade de cicatrização, no caso deles, que foram tratados com 5% e 10% de extrato metanólico de *Achyranthes aspera*, pode ser devido a quimiotaxia e atividade mitogênica, ou seja, a capacidade de promoção da mitose dos linfócitos, que o extrato vegetal possui, e que podem contribuir na cura das lesões. Isso sugere função quimiotática ou mitogênica também da *Croton antisiphiliticus* que apresentou em ambas concentrações maior quantidade de feridas classificadas como intensas quanto ao infiltrado linfocítico, o que foi diferente das feridas ST que tiveram maior quantidade de feridas classificadas como discretas, porém, os grupos ST obtiveram fechamento das feridas em tempo menor que as feridas tratadas com o extrato em ambas concentrações, o que pode ser devido aos grupos G5% e G10% ainda se encontrarem nas primeiras etapas do processo cicatricial. Quanto maior a quantidade de elementos a serem fagocitados e debridados maior será o tempo de ação dos macrófagos, retardando o processo de cicatrização, o que parece ter acontecido neste estudo. É sugerido então novos estudos a fim de identificar essas possíveis ações.

Em relação a proliferação fibroblástica no estudo com a *Croton antisiphiliticus* não foram obtidas diferenças entre os grupos de feridas. Apesar de a maioria das feridas terem sido classificadas como intensidade moderada nos animais tratados com extrato etanólico da *Croton antisiphiliticus* nas concentrações de 5% e 10%, estas foram as feridas que apresentaram menor índice de retração em comparação com feridas mantidas sem tratamento e as feridas tratadas apenas com o veículo, que também tiveram a maior quantidade de feridas classificadas com proliferação fibroblástica moderada. O tecido cicatricial de feridas tratadas com *Passiflora edulis* no estudo de Garros *et al.*, (2006), foi considerado estatisticamente significativo na

proliferação fibroblástica apenas na comparação entre os grupos no 7º dia de pós-operatório, no 14º e 21º dias não houve diferença. Neste estudo da *Croton antisiphiliticus*, foi realizada a análise da proliferação fibroblástica em apenas um tempo, o que pode ter ocultado qualquer outro resultado estatisticamente significativo. No tratamento com extrato metanólico de *Achyranthes aspera* L. em diferentes concentrações para o processo cicatricial, foi identificada intensa proliferação de fibroblastos, o que pode estar intimamente relacionado ao potencial cicatrizante deste extrato, já que estão envolvidos na síntese de colágeno (FIKRU *et al.*, 2012).

Visto que os fibroblastos estão intimamente relacionado ao processo de cura de uma tecido lesado, a sua presença de forma discreta nos tecidos ou mesmo sua inibição está associada à presença de exsudato, o que retarda de forma consequente o processo cicatricial (SEAH *et al.*, 2005).

Na avaliação estatística do processo de re-epitelização, os grupos do presente estudo não apresentaram diferenças; o grupo que apresentou maior quantidade de feridas com o fechamento completo foi grupo sem tratamentos (Grupo ST); os tratamentos que obtiveram menor número de animais com fechamento completo do tecido lesado foram os tratados com o extrato da *Croton antisiphiliticus* em ambas concentrações. Estes dados apesar de não terem apresentado diferenças, são compatíveis com o menor tempo de cicatrização dos grupos controle. No estudo sobre o potencial cicatrizante da *Passiflora edulis*, a diferença do grupo controle no processo de re-epitelização no 7º dia de pós-operatório foi estatisticamente significativa, mas não foram observadas diferenças significantes na re-epitelização no 14º e no 21º dia de pós-operatório (GARROS *et al.*, 2006). No presente estudo com a *Croton antisiphiliticus* foi realizada a análise da re-epitelização em apenas um tempo, o que pode ter ocultado qualquer outro resultado estatisticamente significativo. A atividade cicatricial da *Zeyheria tuberculosa* foi validada por Sarmiento *et al.* (2014), em seu estudo, de forma macroscópica, o fechamento total das lesões não ocorreu em todos os grupos ao longo dos 14 dias de experimento; porém, conforme observado em cortes histológicos de amostra dos tecidos, foi identificada a presença de re-epitelização; o que confirmou uma redução da área da lesão.

Por último, no presente estudo com extratos etanólicos da *Croton antisiphiliticus* a 5% e 10% a avaliação da colagenização nas amostras dos tecidos cicatriciais, os grupos de feridas não apresentaram diferenças. É notado que nos animais tratados com o extrato a 10% todas as amostras foram classificadas como discreta em relação à formação do colágeno, com presença de tecido conjuntivo frouxo, sendo observado o mesmo padrão nas feridas tratadas com o extrato da *Croton antisiphiliticus* a 5%.

O colágeno desempenha um importante papel na cura de feridas; atua na hemostasia e como principal constituinte do tecido conjuntivo, fornecendo um quadro estrutural para a regeneração tecidual e consequente força e integridade à matriz da ferida; além de intensificar as interações célula-célula e célula-matriz (CHITHRA; SAJITHLAL; CHANDRAKASAN, 1998).

A qualidade do tecido reparado é um resultado da quantidade e da organização do colágeno, sendo a cicatriz mais resistente conforme as fibras de colágeno vão se organizando; no entanto, uma cicatriz nunca conseguirá atingir a mesma resistência de um tecido íntegro (ROSA; ROSÁRIO, 2009; CAPELLA *et al.*, 2016).

Em estudo que avaliou o potencial cicatricial da *Bixa orellana* L. (extrato oleoso de urucum) em feridas cutâneas, foi observada a aproximação das bordas das feridas ao longo do período experimental, porém levaram a uma cicatriz de baixa qualidade; em análise histológica, o colágeno observado apresentava um padrão desorganizado (CAPELLA *et al.*, 2016).

No estudo sobre o potencial cicatrizante da *Passiflora edulis*, a colagenização na reação inflamatória crônica, foi similar entre os grupos no 7º dia de pós-operatório. Entretanto, no 14º dia de pós-operatório houve diferença entre os grupos (GARROS *et al.*, 2006).

Na *Memora nodosa*, ao ser avaliado o potencial cicatricial, não foi observada diferença na colagenização dos grupos tratados e controles (TRESVENZOL *et al.*, 2013).

O tratamento com extrato metanólico *Achyranthes aspera* L. pode contribuir para a estimulação de proliferação e aumento da síntese de colágeno, facilitando as mudanças na contração da ferida e período de epitelização (FIKRU *et al.*, 2012).

No estudo de Udegbunam *et al.* (2015) foi investigado o potencial de cicatrização de feridas do extrato metanólico do bulbo de *Crinum jagus* usando dentre outros modelos o de excisão, no qual ratos foram tratados topicamente com extrato da planta a 5% e 10%. Obtiveram que o extrato metanólico do bulbo de *Crinum jagus* a 10% apresentou porcentagem de contração da ferida maior, menor tempo de re-epitelização e de cicatrização, além de maior deposição de colágeno Tipo 1 em comparação com extrato metanólico do bulbo de *Crinum jagus* 5% e do medicamento de referência, sulfato de frameticina; o que estabelece que o extrato de bulbo metanólico de *Crinum jagus* potencializa a cura de feridas (UDEGBUNAM *et al.*, 2015).

É sabido que o meio úmido é mais propício para a realização de uma eficiente cicatrização devido a migração de fibroblastos e macrófagos, além de proporcionar a produção da matriz extracelular (KAWABATA *et al.*, 2018). Contrapondo-se a isto, no presente estudo foi verificado que as lesões mantidas secas, sem qualquer cobertura para tratamento,

apresentaram menor tempo de cicatrização do que aquelas feridas tratadas com os extratos nas duas concentrações. A cobertura natural com o coágulo pode ter sido eficaz na proteção e cicatrização das feridas.

Este trabalho de avaliação da atividade cicatrizante de extratos etanólicos da *Croton antisiphiliticus* a 5% e a 10% não conseguiu comprovar em modelo experimental a eficácia para o tratamento de feridas.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao final dos 28 dias de tratamento os grupos de feridas tratadas com os extratos etanólicos da *Croton antisiphiliticus* a 5% ou a 10%, e os grupos controle sem tratamento e o tratado apenas com o gel, apresentavam-se em uma etapa de transição entre as fases proliferativa e de remodelação.

Os resultados do presente estudo permitem concluir que o uso tópico do extrato etanólico da *Croton antisiphiliticus* a 5% ou a 10%, apresentam efeito de retardo na cicatrização da pele em feridas cirúrgicas de ratos e serve de alerta para a população que utiliza o extrato desta planta com finalidade de cicatrização de lesões.

Destacamos que o gel utilizado como veículo para extratos não foi um fator interferente na cicatrização, visto que o mesmo também foi utilizado como um dos tratamentos controle e obteve uma recuperação melhor das lesões quando comparado com a utilização dos extratos.

O emprego do extrato etanólico da *Croton antisiphiliticus* no processo de cicatrização de feridas cutâneas permanece ainda campo aberto a estudos, no entanto é importante que se amplie o estudo experimental com outras doses e com análise de outros tempos do processo cicatricial, bem como possíveis mecanismos envolvidos no processo cicatricial.

REFERÊNCIAS

- ABDULLA, M.A. *et al.* Wound Healing Activities of *Raffesia Hasseltii* Extract in rats. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 45, n. 3. 2009.
- AHCPR - Agency for Health Care Policy and Research. Pressure ulcers in adults: prediction and prevention -U.S. Clinical practice Guideline. **Department of Health and Human Services**, n. 3. 1992.
- AKHAVANI, M.A. *et al.* Angiogenesis and plastic surgery. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, v. 61, n. 12, p. 1425-1437. 2008.
- AL-BAYATYA, F.H. *et al.* Effect of *Andrographis paniculata* leaf extract on wound healing in rats. **Natural Product Research**, v. 26, n. 5, 423–429, march. 2012.
- ALVES, D.F.S. *et al.* Translation and adaptation of the bates-jensen wound assessment tool for the brazilian culture. **Texto e Contexto Enfermagem**, v. 24, n. 3, p. 826-833. 2015.
- ALVES, G. S. P.; POVH, J.A. Estudo etnobotânico de plantas medicinais na comunidade de Santa Rita, Ituiutaba – MG. **Revista Biotemas**, v. 26, n. 3, p. 231-242, setembro. 2013.
- ARAÚJO-JUNIOR, V.T. *et al.* Muscicapines, a new class of guaiane-type sesquiterpene alkaloids from *Croton muscicapa*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 553-557. 2005.
- AUGUSTINE, R.; KALARIKKAL, N.; THOMAS, S. Advancement of wound care from grafts to bioengineered smart skin substitutes. **Progress in Biomaterials**, v. 3, p. 103-113. 2014.
- BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n.1, p. 27-51. 2005.
- BALEKARA, N. *et al.* Evaluation of the wound healing potential of *Wedelia trilobata* (L.) leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, p. 817– 824. 2012.
- BANKS, W.J. **Histologia Veterinária Aplicada**. 2 ed. São Paulo: Manole, 629 p. 1992.
- BAO, P. *et al.* The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. **Journal of Surgical Research**, v. 153, n. 2, p. 347-358. 2009.
- BARROS, M.A. Flora medicinal do Distrito Federal. **Brasil Florestal**, v. 50, p. 35-45. 1982.
- BATISTA, E.K.F. *et al.* Atividades antinociceptiva e antiinflamatória do extrato etanólico de *Luehea divaricata*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. Campinas, v. 18, n. 2, p. 433-441. 2016.
- BEHEREGARAY, W.K. *et al.* Eletroestimulação na cicatrização de feridas cutâneas experimentais em coelhos. **Ciência Rural**, v. 44, n. 5, maio. 2014.

BERGSTROM, N. *et al.* Multi-site of incidence of pressure ulcers and the relationship between risk level, demographic characteristics, diagnoses, and prescription of preventive interventions. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 44, p. 22-30. 1996.

BERRY, P.E. *et al.* Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonaeae (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS and *trnL-trnF* sequence data. **American Journal of Botany**, v. 92, p. 1520–1534. 2005.

BFG – The Brazil Flora Group. 2015. **Growing knowledge: An overview of Seed Plant diversity in Brazil**. Rodriguésia, v. 66, n. 4, p. 1085-1113. 2015

BHASKAR, A.; NITHYA, V. Evaluation of the wound-healing activity of *Hibiscus rosa sinensis* L (Malvaceae) in Wistar albino rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 44, n. 6. december. 2012.

BOATENG, J.S. *et al.* Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 97, n.8, p. 2892-923, august. 2008.

BOTREL, R.T. *et al.* 2006. Uso da vegetação nativa pela população local no município de Ingaí, MG, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, v. 20, p. 143-156.

BOURS, G.J.J. *et al.* Prevalence, risk factors and prevention of pressure ulcers in Dutch intensive care units. **Intensive Care Medicine**, v. 27, p. 1599-1605. 2001.

BRAGA, F.C. *et al.* Screening Brazilian plant species for in vitro inhibition of 5-lipoxygenase. **Phytomedicine**, v. 6, p. 447–452. 2000.

BRANDÃO, M.G.L. *et al.* Useful Brazilian plants listed in the field books of the French naturalist Auguste de Saint-Hilaire (1779–1853). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, p. 488–500. 2012.

BRASIL. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. **Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências**. Brasília, 8 de outubro de 2008.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Relatório de recomendação. **Membrana de Biocelulose no tratamento de: lesões cutâneas com perda de pele, úlceras venosas e arteriais, lesões por pressão, queimaduras de segundo grau e áreas doadoras de enxerto**. Nº 328 Janeiro/2018.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo. Patologia Geral**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2016.

BROUGHTON, G.; JANIS, J.E.; ATTINGER, C.E. Wound healing: an overview. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, s. 7, p. 1-32. 2006.

BRUNING, M.C.R.; MOSEGUI, G.B.G.; VIANA, C.M.M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu-Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 17, n. 10, p.

2.675-2.685. 2012.

BUNTROCK, P.; JENTZSCH, K.D.; HEDER, G. Stimulation of wound healing, using brain extract with fibroblast growth factor (PGF) activity: II. Histological and morphometric examination of cells and capillaries. **Experimental pathology**, v. 21, p. 62–67. 1982.

CAMPOS, A.C.L.; BORGES-BANCO, A.; GROTH, A.K. Cicatrização de feridas. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 20 n. 1, p. 51–58. 2007.

CAMUESCO, D. *et al.* The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression. **British journal of pharmacology**, v. 143, p. 908-918. 2004.

CAPELLA, S.O. *et al.* Potencial cicatricial da Bixa orellana L. em feridas cutâneas: estudo em modelo experimental. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 1, p. 104-112. 2016.

CARVALHO, F.K. **Análise fitoquímica e atividade biológica de *Croton antispylliticus* Martius e *Croton heterodoxus* Bailon**. 2013. 224 p. Tese (Doutorado em Química)- Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

CARVALHO, P.T.C. **Análise da cicatrização de lesões cutâneas através da espectrofotometria: estudo experimental em ratos diabéticos**. 2002. 93 p. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia)- Instituto de Química de São Carlos, Universidade Federal e São Paulo. Ribeirão Preto, 2002.

CAVÉCHIA, L.A.; PROENÇA, C.E.B. Resgate cultural de usos de plantas nativas do cerrado pela população tradicional da região do atual Distrito Federal. Brasília: **Heringeriana**, v.1, n. 2, p. 11-24, dezembro. 2007.

CHITHRA, P.; SAJITHLAL, G.B.; CHANDRAKASAN, G. Influence of *Aloe vera* on the glycosaminoglycans in the matrix of healing dermal wounds in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 59, p. 179–186. 1998.

COFFELT, T. A.; BAUER, B. D.; CARROLL, A. E. Inpatient characteristics of the child admitted with chronic pain. **Pediatrics**, v. 132, n. 2, p. 422-429. 2013.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Resolução Normativa CONCEA nº 15, de 16 de dezembro de 2013**. Baixa a Estrutura Física e Ambiente de Roedores e Lagomorfos do Guia Brasileiro de Criação e Utilização de Animais para Atividades de Ensino e Pesquisa Científica. Diário Oficial da União de 18.12.2013, Seção I, Pág. 9.

CORRÊA, N.F. *et al.* Impact of surgical wound dehiscence on health-related quality of life and mental health. **Journal of Wound Care**, v. 25, n. 10, p. 561–70. 2016.

DAI, C.; SHIH, S.; KHACHEMOUNE, A. Skin substitutes for acute and chronic wound healing: an updated review. **Journal of Dermatological Treatment**, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09546634.2018.1530443>. Acesso em: 05 nov. 2018.

DANTAS, D.V.; TORRES, G.V., DANTAS, R.A.N. Assistência aos portadores de feridas: caracterização dos protocolos existentes no Brasil. **Ciência, cuidado e saúde**. v. 10, n. 2, p. 366-72. 2011.

DIEGELMANN, R.F. Excessive neutrophils characterize chronic pressure ulcers. **Wound Repair and Regeneration**. v. 11, n. 6, p. 490–495. 2003.

DOKE, S.K.; DHAWALE, S.C. Alternatives to animal testing: A review. **Saudi Pharmaceutical Journal**. v. 23, p. 223–229. 2015.

DOMANSKY, R.C.; BORGES, E.L. **Manual para prevenção de lesões de pele: recomendações baseadas em evidências**. 2. ed. Rio de Janeiro: Rubio. 2014.

Encyclopædia Britannica, Inc. 2010, Disponível em:
<https://escola.britannica.com.br/levels/fundamental/assembly/view/135568>. Acesso em: 23 de outubro de 2018.

FARIAS, F.O. **Análise histológica da cicatrização de feridas cirúrgicas padronizadas em ratos utilizando três biomateriais**. 2014. 54 p. Dissertação (Mestrado em Odontologia)-Faculdade de Odontologia Professor Albino Coimbra Filho, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Campo Grande, 2014.

FENNER, R. *et al.* Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 369-394. 2006.

FERNANDES, V.C. *et al.* The epimer of kaurenoic acid from *Croton antisiphiliticus* is cytotoxic towards B-16 and HeLa tumor cells through apoptosis induction. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, p. 1005-1011, april. 2013.

FERREIRA, L.M.; CALIL, J.A. Etiopatogenia e tratamento das úlceras por pressão. **Diagnóstico e Tratamento**, v. 6, p. 36-40. 2001.

FIKRU, A. *et al.* Evaluation of in vivo wound healing activity of metanol extract of *Achyranthes aspera* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, p. 469–474. 2012.

FIGUEREDO, C.A.; GURGEL, I.G. D.; GURGEL JUNIOR, G. D. A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios. **Physis Revista de Saúde Coletiva**. Rio de Janeiro. v. 24, n. 2, p. 381-400. 2014.

FONDER, M.A. *et al.* Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 58, n. 2, p. 185-206, feb. 2008.

FREITAS, R.P.A. *et al.* Laserterapia e microcorrente na cicatrização de queimadura em ratos. Terapias associadas ou isoladas? **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 20, n. 1, p. 24-30. 2013.

FRYKBERG, R.G.; BANKS, J. Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. **Advances in Wound Care (New Rochelle)**, v. 4, n. 9, p. 560-582, sep. 2015.

- GALVEZ, J. *et al.* Antidiarrheic activity of *Euphorbia hirta* extract and isolation of an active flavonoid constituent. **Planta Médica**, v. 59, p. 333-336. 1993.
- GARROS, I.C. *et al.* Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 3, p. 55-65. 2006.
- GEFEN, A.; KOTTNER, J.; SANTAMARIA, N. Clinical and biomechanical perspectives on pressure injury prevention Research. **Clinical Biomechanics**, v. 38, p. 29–34. 2016.
- HELUANI, C.S. *et al.* Three new diterpenoids based on the novel sarcopetalane skeleton from *Croton sarcopetalus*. **Journal of natural products**, v. 63, p. 222-225. 2000.
- HIRSCHMANN, G.S.; ARIAS, A.R. A survey of medicinal plants of Minas Gerais, Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 29, p. 159-172. 1990.
- JÄRBRINK, K. *et al.* The humanistic and economic burden of chronic wounds: a protocol for a systematic review. **Systematic Reviews**, v. 6, n. 1, p.15. 2017.
- JUNQUEIRA LC; CARNEIRO J. **Histologia básica: texto e atlas**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 359-370. 2014.
- KARAKAS, F.P. *et al.* The evaluation of topical administration of *Bellis perennis* fraction on circular excision wound healing in Wistar albino rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 8, p. 1031–1037. 2012.
- KAWABATA, S. *et al.* The Utility of Silk-elastin Hydrogel as a New Material for Wound Healing. **Plastic and Reconstructive Surgery – Global Open**, v. 6; 6p, may. 2018.
- KOTTNER, J.; LICHTERFELD, A.; BLUME-PEYTAVI, U. Maintaining skin integrity in the aged: a systematic review. **British Journal of Dermatology**, vol. 169, n. 3, p. 528-542. 2013.
- LAWRENCE, W.T.; DIEGELMANN, R.F. Growth factors in wound healing. **Clinics in Dermatology**, v. 12, n. 1, p. 157-69. 1994.
- LIEDKE, D.C.F.; JOHANN, D.A.; DANSKI, M.T.R. Consultório de enfermagem para tratamento de feridas em hospital de ensino. **Cogitare Enfermagem**, v. 19, n. 3, p. 590-596. jul/set. 2014.
- LIMA, A.C.B.; GUERRA, D.M. Avaliação do custo do tratamento de úlceras por pressão em pacientes hospitalizados usando curativos industrializados. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 16, n. 1, p. 267-277. 2011.
- MAJEWSKA, I.; GENDASZEWSKA-DARMACH, E. Proangiogenic activity of plant extracts in accelerating wound healing – a new face of old phytomedicines. **Acta Biochimica Polonica**, v. 58, n. 4, p. 449-60. 2011.

- MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, É. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003.
- MANLEY, M.T. Incidence, contributory factors and costs of pressure sores. **South African Medical Journal**, v. 53, p. 217-222. 1978.
- MATOS, L.M.M. **Química de espécies nativas de Croton L.(Euphorbiaceae)**. Número de páginas 123 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica. São Paulo. 2011.
- MAURYA, H.; SEMWAL, M.; DUBEY, S.K. **Pharmacological Evaluation of *Chrozophora tinctoria* as Wound Healing Potential in Diabetic Rat's Model**. 7 p. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7475124>. Acesso em 20 de outubro de 2018.
- MAYER, D. *et al.* Cell salvage in acute and chronic wounds. **Journal of Wound Care**, v. 27, n. 9, september. 2018.
- MEKONNEN, A. *et al.* In vivo wound healing activity and phytochemical screening of the crude extract and various fractions of *Kalanchoe petitiiana* A. Rich (Crassulaceae) leaves in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, p. 638–646. 2013.
- MIURA, K.; YAMASHITA, K. Evaluation of aging, diabetes mellitus, and skin wounds by scanning acoustic microscopy with protease digestion. **Pathobiology of Aging and Age-Related Diseases**, vol. 8. 2018.
- MOLINARO, E.M.; CAPUTO, L.F.G.; AMENDOEIRA, M.R.R. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio; Instituto Oswaldo Cruz, v. 2. 2010.
- MORAIS, G.F.C.; OLIVEIRA, S.H.S.; SOARES, M.J.G.O. Avaliação de feridas pelos enfermeiros de instituições hospitalares da rede pública. **Texto Contexto Enfermagem**, Florianópolis. v. 17, n. 1, p. 98-105, jan-mar. 2008.
- MOREIRA, D.L.; GUARIM-NETO, G. Usos múltiplos de plantas do cerrado: um estudo etnobotânico na comunidade sítio Pindura, Rosário Oeste, Mato Grosso, Brasil. **Polibotanica**, v. 27, n. 159-190. 2009.
- MORESCHI, D. A. B.; LEITE-MELLO, E. V. de S.; BUENO, F. G. Ação cicatrizante de plantas medicinais: um estudo de revisão. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR, Umuarama**, v. 22, n. 1, p. 63-69, jan./abr. 2018.
- MOURA, S.A.L. **Desenvolvimento de modelo experimental para estudo do processo de cicatrização por segunda intenção de feridas cutâneas em coelhos, utilizando extratos da própolis verde de Minas Gerais-Brasil**. 2004. 76p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)- Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais- Brasil. 2004.
- MÜGGE, F.L.B.; PAULA-SOUZA, J.; MELO, J.C.; BRANDÃO, M.G.L. Native plant species with economic value from Minas Gerais and Goiás: a discussion on the currentness of the data recovered by the French naturalist Auguste de Saint-Hilaire. **Horticultura Brasileira**, v. 34, p. 455-462, out.- dez. 2016.

MUZITANO, M.F. *et al.* Quercitrin: an antileishmanial flavonoid glycoside from *Kalanchoe pinnata*. **Planta médica**, v. 72, p. 81-83. 2006.

NAYAK, B.S. *et al.* *Neurolaena lobata* L. promotes wound healing in Sprague Dawley rats. **International Journal of Applied and Basic Medical Research**, v. 4, n. 2, jul-dec. 2014.

NADER, T.T. *et al.* Avaliação *in vitro* da eficácia de extratos de plantas medicinais do cerrado frente *Staphylococcus aureus* isolado de diferentes fontes de propriedades leiteiras. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, p. 429-433. 2010.

NAGORI, B.; SOLANKI, R. Role of medicinal plants in wound healing. **Research Journal of Medicinal Plants**, v. 5, p. 392-405. 2011.

NEPSTAD, D. *et al.* Slowing Amazon deforestation through public policy and interventions in beef and soy supply chains. **Science**, v. 344, p. 1118-1123. 2014.

NEVILLE, J.A. *et al.* Increase in procedures performed at dermatology office visits from 1995 to 2001. **Dermatologic surgery**, v. 31, n.2, p. 160-162, feb. 2005.

NEVILLE, R.F. *et al.* The diabetic foot. **Current Problems in Surgery**, v. 53, p. 408- 437. 2016.

NGUYEN, D.T.; ORGILL, D.P.; MURPHY, G.F. The pathophysiologic basis for wound healing and cutaneous regeneration. **Biomaterials for treating skin loss**. Cambridge, Boca Raton: Woodhead Publishing, CRC Press. p. 25-57. 2009.

NICKS, B.A. *et al.* Acute wound management: revisiting the approach to assessment, irrigation, and closure considerations. **International Journal of Emergency Medicine**. v. 3, n. 4, p. 399-407. 2010.

NPUAP. **National Pressure Ulcer Advisory Panel**. Abril de 2016. Disponível em <http://www.npuap.org/resources/educational-and-clinical-resources/npuap-pressure-injury-stages/>. Acesso em: 13 de novembro de 2018.

OLIVEIRA, B.G.R.B.; CASTRO, J.B.A.; GRANJEIRO, J.M. Panorama epidemiológico e clínico de pacientes com feridas crônicas tratados em ambulatório. **Revista de enfermagem da UERJ**, Rio de Janeiro. v. 21, n. esp.1, p. 612-617, dez. 2013.

OLIVEIRA, T.G. *et al.* Micropropagação de *Croton antisiphiliticus* Mart. **Ciência Rural**, v.41, n.10, out. 2011.

OSTVAR, O. *et al.* Effect of platelet-rich plasma on the healing of cutaneous defects exposed to acute to chronic wounds: a clinic-histopathologic study in rabbits. **Diagnostic Pathology**, v.10, p. 85-91. 2015.

PEREIRA, S. *et al.* An ent-Kaurane-Type diterpene in *Croton antisiphiliticus* Mart. **Molecules**, v. 17, p. 8851–8858. 2012.

PEREIRA, Z.V. *et al.* Levantamento das Plantas Medicinais do Cerrado sensu stricto da Fazenda Paraíso – Dourados, MS. **Revista Brasileira de Biociencias**, v. 5, p. 249-251. 2007.

PÉREZ, M.B. *et al.* Epidemiology of venous leg ulcers in primary health care: Incidence and prevalence in a health centre- A time series study (2010-2014). **International Wound Journal**, p. 1–10, 2018.

PIO-CORREA, M. **Dicionário de plantas uteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: **Imprensa Nacional**, v. 5. 1974.

PITTS, S.R. *et al.* National Hospital Ambulatory Medical Care Survey: 2006 emergency department summary. **National health statistics reports**, v. 6, n. 7, p. 1-38, aug. 2008.

PONRASU T, SUGUNA L. **Efficacy of a *Annona squamosa* on wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats**. *International Wound Journal*. 2012. Doi: 10.1111/j.1742-481X.2011.00924.x. 11p.

PREMPRASERT, C. *et al.* Anti-inflammatory activity of diterpenes from *Croton stellatopilosus* on LPS-induced RAW264.7 cells. **Journal of Natural Medicines**, v. 67, p. 174-181. 2012.

REIS, G. O. *et al.* *Croton antisiphiliticus* Mart. attenuates the inflammatory response to carrageenan-induced pleurisy in mice. **Inflammopharmacol**, v. 22, p. 115–126. 2014.

REIS, R.O. **Estudo do efeito anti-inflamatório da *Croton antisiphiliticus* Mart. (Euphorbiaceae) no modelo de pleurisia induzida por Carragenina, em Camundongos**. UFSC, Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas. Florianópolis, 2013.

RIBEIRO, D.A. *et al.* Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área da Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. v.16, p.912-930, 2014.

RODRIGUES, V.E.G.; CARVALHO, D.A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do alto Rio Grande-Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, p. 102-123. 2001.

ROSA, M.P.; ROSARIO, V.S. Anti-inflammatory and wound healing potential of *Prosthechea michuacana* in rats. **Pharmacognosy Magazine**, v. 5, p. 219–222. 2009.

SÁ, N.C. *et al.* Antimicrobial and antibiofilm action of casbane diterpene from *Croton nepetaefolius* against oral bacteria. **Archives of Oral Biology**, v. 57, p. 550–555. 2012.

SAHLE, F. F. *et al.* Skin Diseases Associated with the Depletion of Stratum Corneum Lipids and Stratum Corneum Lipid Substitution Therapy. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 28, p. 42-55. 2015.

SALATINO, A.; SALATINO, M.L.F.; NEGRI, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, p. 11–33. 2007.

SANTOS, J.A.A. *et al.* Avaliação histomorfométrica do efeito do extrato aquoso de urucum (norbixina) no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. Campinas, v.16, n.3, supl. I, p. 637-643. 2014.

- SARMENTO, P.A. *et al.* Avaliação do extrato da *Zeyheria tuberculosa* na perspectiva de um produto para cicatrização de feridas. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 22, n. 1, p. 165-172 jan.-fev. 2014.
- SASANKA, C.S. Venous ulcers of the lower limb: where do we stand? **Indian Journal of Plastic Surgery**, v. 45, n. 2, p. 266-274. 2012.
- SEAH, C.C. *et al.* Chronic wound fluid suppresses proliferation of dermal fibroblasts through a Rasmediated signaling pathway. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 124, p. 466-474. 2005.
- SEELEY, R.; STEPHENS, T.; TATE, P. **Anatomia e Fisiologia**. 3. ed. Lusociência, 1280p. 2011.
- SEN, C.K. *et al.* Human skin wounds: A major and snowballing threat to public health and the economy. **Wound Repair and Regeneration**, v. 17, p. 763–771. 2009.
- SHARPE, J.R.; MARTIN, Y. Strategies demonstrating efficacy in reducing wound contraction in vivo. **Advances in Wound Care (New Rochelle)**, v. 2, p. 167-175. 2013.
- SINGER, A.J.; TASSIOPOULOS, A.; KIRSNER, R.S. Evaluation and management of lower-extremity ulcers. **New England Journal of Medicine**, v. 377, p. 1559-1567. 2017.
- SLATTER, D. **Textbook of smal animal surgery**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, v. 2, n. 2, 1141p. 1998.
- SLOMP, L. *et al.* In vitro nematocidal effects of medicinal plants from São Paulo state, Brazil. **Pharmaceutical Biology**, v. 47, p. 230-235. 2009.
- SODRÉ, R.C.; da SILVA, M.J. O gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae s.s. – Crotonoideae) na Floresta Nacional de Silvânia, Goiás, Brasil. **Iheringia, Série Botânica**. Porto Alegre, v. 70, n. 1, p. 89-104, junho. 2015.
- SOUZA, L.F. *et al.* Plantas medicinais referenciadas por raizeiros no município de Jataí, estado de Goiás. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. Campinas, v. 18, n. 2, p. 451-461. 2016.
- SPEAR, M. Acute or chronic? What's the difference? **Plastic Surgical Nursing**, v. 33, n. 2, p. 98-100. 2013.
- SZABO, S., *et al.* Growth factors: New endogeneous drug for ulcer healing. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 210, p. 15-18. 1995.
- TAZIMA, M.F.G.S.; VICENTE, Y.A.M.V.A.; MORIYA T. Biologia da ferida e cicatrização. **Medicina Ribeirão Preto**. v.41, p. 259-264. 2008.
- TRESVENZOL, L.M.F. *et al.* Avaliação da toxicidade aguda e da atividade cicatrizante dos extratos etanólicos das folhas e raízes da *Memora nodosa* (Silva Manso) Miers (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. Campinas, v.15, n.3, p.423-430,

2013.

TROSTRUP, H. *et al.* Uncontrolled gelatin degradation in non-healing chronic wounds. **Journal of Wound Care**, v. 27, n. 11, p. 724-734, november. 2018.

UDEGBUNAM, S.O. *et al.* Wound healing and antibacterial properties of methanolic extract of *Pupalia lappacea* Juss in rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.14, n. 157, 8 p. 2014.

UDEGBUNAM, S.O. *et al.* Evaluation of wound healing potential of methanolic *Crinum jagus* bulb extract. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**, v. 4, n. 3. 2015.

UPPUNGUNDLA, N. *et al.* Switchgrass water extracts: extraction, separation and biological activity of rutin and quercitrin. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, p. 7763-7770. 2009.

VAN EE, B.W.; RIINA, R.; BERRY, P.E. A revised infrageneric classification and molecular phylogeny of New World *Croton* (*Euphorbiaceae*). **Taxon**, v. 60, n. 3, p. 791-823. 2011.

VILA VERDE, G.M.; PAULA, J.R.; CANEIRO, D.M. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do cerrado utilizadas pela população de Mossâmedes (GO). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 64-66. 2003.

WINKLER, J. The Management of the pressureulcer population in an extended care setting. In: Krasner D. Chronic wound care: a clinical source book for healthcare professionals. **Health Management Publication**. Pennsylvania, p.170-175. 1990.

WINTER, G.D. Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. **Nature**, v. 193, p. 293-294. 1962.

WITTE, M.B.; BARBUL, A. General principles of wound healing. **Surgery Clinics of North America**, v. 77, n. 3, p.509-528. 1997.

YADAV, K.S. *et al.* An Assessment of Wound Healing Potential of *Argyreia speciosa* Leaves. **The Scientific World Journal**. Hindawi Publishing Corporation, 6p. 2014.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/406921>. Acesso em: 20 de outubro de 2018.